

12/PRTS

10/501930

明細書

DT04 Rec'd PCT/PTO 29 JUL 2004

糖鎖合成酵素

技術分野

本発明は糖鎖合成酵素および該酵素をコードするDNAに関するものである。さらに詳しくは、本発明はムチンなどのO型糖鎖のうち、末端に Sia α 2, 3(6) Gal (Sia: シアル酸、Gal: ガラクトース) 構造をもつ糖鎖のシアル酸部分に α 2, 8 の結合様式でシアル酸を効率良く転移する酵素 (O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素、ST8Sia VI) および該酵素をコードするDNA ; 並びに、オリゴ糖などの糖鎖のうち、末端に Gal β 1, 4GlcNAc (Gal: ガラクトース、GlcNAc: N-アセチルグルコサミン) 構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6 の結合様式でシアル酸を効率良く転移する酵素 (ST6Gal II) および該酵素をコードするDNAに関するものである。本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素および β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための試薬、その他、酵素阻害剤等として有用である。

背景技術

シアル酸は、たとえば細胞-細胞間伝達、細胞基質相互作用、細胞接着などの重要な生理作用を司る物質である。発生、分化の過程に特異的な、あるいは臓器特異的なシアル酸含有糖鎖の存在が知られている。シアル酸は糖タンパク質および糖脂質の糖鎖部分の末端位置に存在しており、これらの部位へのシアル酸の導入は、酵素的に CMP-Sia からの転移によってなされる。

このシアル酸の酵素的導入 (シアル酸転移) を担う酵素は、シアル酸転移酵素 (sialyltransferase) と呼ばれるグリコシルトランスフェラーゼ類である。ほ乳類では現在までに 18 種類のシアル酸転移酵素の存在が知られているが、これらはシ

アル酸の転移様式から 4 つのファミリーに大別される (Tsuji, S. (1996) *J. Biochem.* 120, 1-13)。すなわち、 $\alpha 2, 3$ の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素 (ST3Gal-ファミリー)、 $\alpha 2, 6$ の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 (ST6Gal-ファミリー)、 $\alpha 2, 6$ の結合様式で N-アセチルガラクトサミンにシアル酸を転移する GalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 (ST6GalNAc-ファミリー)、および $\alpha 2, 8$ の結合様式でシアル酸にシアル酸を転移する $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素 (ST8Sia-ファミリー) である。

このうち $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素については現在までに 5 種類の酵素 (ST8Sia I-V) について cDNA クローニングが行われており、その酵素学的諸性質も明らかになっている (Yamamoto, A. *et al.* (1996) *J. Neurochem.* 66, 26-34; Kojima, N. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 360, 1-4; Yoshida, Y. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 14628-14633; Yoshida, Y. *et al.* (1995) *J. Biochem.* 118, 658-664; Kono, M. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 29366-29371)。ST8Sia I はガングリオシドの GD3 合成酵素であり、ST8Sia V は同じくガングリオシドの GD1c, GT1a, GQ1b, GT3 などを合成する酵素である。ST8Sia II, IV は神経細胞接着分子 (NCAM) の N 型糖鎖上にポリシアル酸を合成する酵素である。ST8Sia III は糖タンパク質の N 型糖鎖および糖脂質に見いだされる Sia $\alpha 2, 3$ Gal $\beta 1, 4$ GlcNAc 構造にシアル酸を転移する酵素である。これらの酵素はいずれも糖脂質あるいは N 型糖鎖を好ましい基質としており、O 型糖鎖に対する活性は、NCAM の一つのアイソフォームに見いだされる O 型糖鎖上に ST8Sia II, IV がオリゴシアル酸/ポリシアル酸を合成する例と、脂肪細胞特異的糖タンパク質 AdipoQ の O 型糖鎖に ST8Sia III が作用する例が報告されているだけである (Suzuki, M. *et al.* (2000) *Glycobiology* 10, 1113; 及び Sato C, *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 28849-28856)。すなわち今までに報告されてきている $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素は、通常 O 型糖鎖を好ましい基質としてはおらず、これを好ましい基質とする $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素の存在は知られていなかった。

また、 β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素については現在までに 1 種類の

酵素 (ST6Gal I) についてのみ cDNA クローニングが行われており、その酵素学的諸性質も明らかになっている (Hamamoto, T. and Tsuji, S. (2001) ST6Gal-I in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (Taniguchi, N. et al. Eds.) pp295-300)。ST6Gal I は糖タンパク質、オリゴ糖またはガングリオシドなどの末端糖鎖部分に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつものに対して活性を示すが、Gal β 1, 4GlcNAc 構造のほかにラクトース (Gal β 1, 4Glc) や場合によっては Gal β 1, 3GlcNAc 構造でも基質にすることができる基質特異性の広い酵素である。基質特異性が広いということは、例えば ST6Gal I を利用した機能性オリゴ糖などの合成の際に、原材料に不純物が混入していると、それらも基質となって副産物が生じてしまう可能性が考えられる。従ってこの問題を解決するためには、基質特異性に関してより選択性の高い酵素が要求される。しかし現在までに β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性をもち、基質特異性に関してより選択性の高い哺乳動物由来の酵素は知られていなかった。

発明の開示

上記した通り、今までに知られている α 2, 8-シアル酸転移酵素は 5 種類存在するが、これらはいずれも N 型糖鎖をもつ糖タンパク質またはガングリオシドなどの糖脂質を主な基質とし、O 型糖鎖をもつ糖タンパク質に対しては活性を全く示さないか、限定的な活性を示すだけであった。本発明の第一の目的は、O 型糖鎖に対し高い活性を示す新規な O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素を提供することである。また、本発明は、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードする cDNA をクローニングし、該 O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードする DNA 配列および該酵素のアミノ酸配列を提供することを目的とする。さらに本発明は、上記の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素の構造のうち、活性に係わる部分を大量に蛋白として発現させることを目的とする。

さらにまた上記した通り、哺乳動物で今までに知られている β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は 1 種類 (ST6Gal I) だけである。これは糖タンパク質、

オリゴ糖またはガングリオシドなどの末端糖鎖部分に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつものに対して活性を示すが、Gal β 1, 4GlcNAc 構造のほかにラクトース (Gal β 1, 4Glc) や場合によっては Gal β 1, 3GlcNAc 構造でも基質にすることができる基質特異性の広い酵素である。本発明の第二の目的は、この基質特異性が広いという問題点を解決し、オリゴ糖上の Gal β 1, 4GlcNAc 構造に対してより選択性の高い基質特異性を示す新規 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素および該酵素をコードする DNA を提供することである。

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意努力し、マウス脳及び心臓の各 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、またマウス腎臓由来 cDNA を鋳型とした PCR を行うことにより、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードする cDNA をクローニングすることに成功した。さらに、本発明者は、ヒトシアル酸転移酵素 ST6Gal I のアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンを expressed sequence tag (dbEST) のデータベースで検索し、GenBank™ accession Nos. BE613250, BE612797, BF038052 の各 EST クローンを取得した。またそれらの塩基配列情報を利用して、dbEST とヒトゲノムの High throughput genomic sequence のデータベースを検索し、関連 EST クローンとゲノム遺伝子の塩基配列情報を取得した。以上の塩基配列情報をもとにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 用のプライマーを作製し、ヒト大腸由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、得られた増幅断片と入手 EST クローン由来の DNA 断片を連結することによって翻訳領域全長を含むクローンを取得した。そして、該クローンによりコードされるタンパク質が β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有していることを確認した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素が提供される。

基質特異性：末端に Sia α 2, 3(6)Gal (ここで、Sia はシアル酸を示し、Gal はガラクトースを示す) 構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる：

好ましくは、本発明により、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードするO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

好ましくは、本発明により、下記の何れかの塩基配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

(3) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列；

(4) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター（好ましくは、発現ベクター）；上記

した組み換えベクターにより形質転換された形質転換体；並びに上記した形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする本発明の酵素の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 26～398 から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 26～398 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 68～398 から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 68～398 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞外分泌型の蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞外分泌型の蛋白質をコードする遺伝子を含む組み換えベクター（好ましくは、発現ベクター）；上記した組み換えベクターにより形質転換された形質転換体；並びに上記した形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする本発明の蛋白

質の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、下記の何れかの塩基配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

(1) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号 8 に記載の塩基配列中の塩基番号 3 番目から 1 5 7 4 番目で特定される塩基配列；又は

(4) 配列表の配列番号 8 に記載の塩基配列中の塩基番号 3 番目から 1 5 7 4 番目で特定される塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクターが提供される。

本発明の組み換えベクターは、好ましくは、発現ベクターである。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする、本発明の酵素の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 3 3 ~ 5 2 9 から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 3 3 ~ 5 2 9 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 3 1 ~ 5 2 4 から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 3 1 ~ 5 2 4 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒

する活性を有するアミノ酸配列：

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の遺伝子を含む組み換えベクターが提供される。

本発明の組み換えベクターは、好ましくは、発現ベクターである。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の形質転換体を培養し培養物から本発明の蛋白質を採取することを特徴とする、本発明の蛋白質の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、マウスおよびヒトの ST8Sia VI cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。N 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。A, マウス ST8Sia VI。 B, ヒト ST8Sia VI。

図2は、アミノ酸配列の比較を示す。

Aは、マウスシアル酸転移酵素 ST8Sia I, ST8Sia V, ST8Sia VI のアミノ酸配列の比較を示す。各シアル酸転移酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。シアリルモチーフ L は二重線で、シアリルモチーフ S は破線で示してあ

る。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸にはアスタリスクを付してある。

Bは、マウス(m)およびヒト(h)の ST8Sia VI のアミノ酸配列の比較を示す。両酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。

図 3 は、結合特異性の解析を示す。

Aは、マウス ST8Sia VI の分泌型組み換えタンパク質 PA-mST8Sia VI により GM3 を [14 C]-NeuAc でシアル化し、それを α 2, 3-, α 2, 6-結合特異的なシアリダーゼ (NANase II)、 α 2, 3-, α 2, 6-, α 2, 8-, α 2, 9-結合特異的なシアリダーゼ (NANase III) で処理した反応産物を HPTLC で展開 (展開溶媒はクロロホルム:メタノール:0.02% CaCl₂=55:45:10) した結果 (上段)、およびヒト ST8Sia VI の分泌型組み換えタンパク質 PA-hST8Sia VI により 3'-sialyllactose を [14 C]-NeuAc でシアル化し、それを NANase II、NANase III で処理した反応産物を HPTLC で展開 (展開溶媒は1-プロパノール:アンモニア水:水=6:1:2.5) した結果 (下段) を示す。

Bは、GM3 を PA-mST8Sia VI によりシアル化した反応産物の TLC 免疫染色の結果を示す。レーン 1, GD3 (1 μ g); レーン 2, GM3 (1 μ g); レーン 3, 反応産物。抗 GD3 モノクローナル抗体 KM641 および Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG + IgM (H+L) で反応させた後、ECL で発色した。

図 4 は、ST8Sia III または ST8Sia VI によって [14 C]-NeuAc を取り込ませた Fetuin を *N*-glycanase で処理した結果を示す。 [14 C]-NeuAc を取り込ませた Fetuin を *N*-glycanase で処理し、SDS-PAGE で解析後、BAS2000 ラジオイメージアナライザーで可視化した。

図 5 は、COS-7 細胞においてマウス ST8Sia VI 全長 cDNA を過剰発現させたときの影響を示す。

Aは、抗 NeuAc α 2, 8NeuAc α 2, 3Gal 抗体 S2-566 を用いて TLC 免疫染色を行った結果を示す。レーン 1, GD3 標準物質 (0.5 μ g); レーン 2, GQ1b 標準物質 (0.5 μ g); レーン 3, コントロールの COS-7 細胞 (30 mg) から抽出した酸性糖脂質画分; レーン 4, マウス全長 ST8Sia VI 発現ベクター pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7

細胞(30 mg)から抽出した酸性糖脂質画分。

Bは、COS-7 細胞または pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7 細胞からミクロソーム画分を調製し、SDS-PAGE に供した後(45 μ g/レーン)、PVDF 膜に転写して S2-566 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果を示す。レーン 1, コントロールの COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分; レーン 2, pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分; レーン 3, コントロールの COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分を *N*-グリカナーゼ処理したもの; レーン 4, pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分を *N*-グリカナーゼ処理したもの。ST8Sia VI cDNA の導入により生じた S2-566 抗体に認識されるバンドの主なものについては、アスタリスクを付してある。

図 6 は、マウスおよびヒトの ST8Sia VI 遺伝子の発現様式を示す。

Aは、マウス各種臓器より調製した poly(A)+ RNA (約 2 μ g/レーン)を用いてマウス ST8Sia VI 遺伝子の発現様式をノーザン解析した結果を示す。

Bは、Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech)を用いてPCR法によりヒト ST8Sia VI 遺伝子の発現様式を解析した結果を示す。ヒト ST8Sia VI 特異的プライマーとして、5'-CCAGTGTCCTCCAGCCTTTTGT-3' (図 1B の塩基番号 608-627 に相当) (配列番号 17) および 5'-TGAGTGGGGAAGCTTTGGTC-3' (図 1B の塩基番号 1407-1426 の相補鎖に相当) (配列番号 18) を用いた (PCR 増幅断片の大きさは 819 bp)。

図 7 は、ヒト ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列、およびその疎水性分布図を示す。

Aは、ヒト ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。*N* 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。

Bは、ヒト ST6Gal II の疎水性分布図を示す。N 末端側の大きな疎水性領域は膜貫通ドメインと予測される。

図 8 は、マウス ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列、およびその疎水性分布図を示す。

A は、マウス ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。N 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。

B は、マウス ST6Gal II の疎水性分布図を示す。N 末端側の大きな疎水性領域は膜貫通ドメインと予測される。

図 9 は、アミノ酸配列の比較を示す。

A は、ヒトシアリル酸転移酵素 ST6Gal I と ST6Gal II のアミノ酸配列の比較を示す。両シアリル酸転移酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。シアリルモチーフ L は二重線で、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸にはアスタリスクを付してある。

B は、ヒト(h)およびマウス(m)の ST6Gal II のアミノ酸配列の比較を示す。両酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。

図 10 は、オリゴ糖に対する活性を示す。様々なオリゴ糖を基質(10 μ g/レーン)として酵素反応を行い、その反応産物を HPTLC で解析(展開溶媒は 1-プロパノール : アンモニア水 : 水=6:1:2.5)した結果を示す。

図 11 は、結合特異性の解析を示す。

A は、ヒト ST6Gal I (上段)、ヒト ST6Gal II (中段)、およびマウス ST6Gal II (下段)を用いて Gal β 1, 4GlcNAc を [14 C]-NeuAc でシアリ化し(レーン 1)、それを α 2, 3-結合特異的シアリダーゼ(NANase I, レーン 2)、 α 2, 3-, α 2, 6-結合特異的シアリダーゼ(NANase II, レーン 3)で処理した反応産物を HPTLC で展開(展開溶媒は 1-プロパノール : アンモニア水 : 水=6:1:2.5)した結果を示す。

B は、ヒト ST6Gal I (上段)、ヒト ST6Gal II (中段)、およびマウス ST6Gal

II（下段）を用いて Gal β 1, 4GlcNAc を [14 C]-NeuAc でシアル化し（レーン 1）、それを β -ガラクトシダーゼで処理した反応産物（レーン 2）、およびコントロールとして Gal β 1, 4GlcNAc を β -ガラクトシダーゼで処理した後に酵素反応を行った試料（レーン 3）を HPTLC で展開（展開溶媒は 1-プロパノール：アンモニア水：水=6:1:2.5）した結果を示す。レーン 2 のバンドがブロードなのは、 β -ガラクトシダーゼ溶液中に含まれている高濃度の硫酸アンモニウムの影響による。

図 1 2 は、ヒト ST6Gal I, ST6Gal II およびマウス ST6Gal II 遺伝子の発現パターンの解析を示す。ヒト ST6Gal I, ST6Gal II 特異的プライマーとヒト組織(A)またはヒト腫瘍細胞(B)の Multiple tissue cDNA panel (Clontech)を用い、両遺伝子の発現パターンを PCR 法で解析した。PCR は 94 度 1 分、50 度 1 分、72 度 1 分 30 秒を 1 サイクルとし、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子については 25 サイクル、ヒト ST6Gal I, ST6Gal II 遺伝子については 40 サイクル行って、反応産物をアガロースゲル電気泳動で解析した。Sk. muscle, skeletal muscle; P. bl. leukocyte, peripheral blood leukocyte。C は、マウス ST6Gal II の発現パターンを、マウス ST6Gal II 特異的プライマーとマウス組織の Multiple tissue cDNA panel (Clontech)を用い、PCR 法で解析した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

(1) 本発明の酵素及び蛋白質

本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする。

基質特異性：末端に Sia α 2, 3(6)Gal（ここで、Sia はシアル酸を示し、Gal はガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質および N 型糖鎖よりも優先的に O 型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

上記した基質特異性及び基質選択性は、本明細書に記載した実施例で取得されたマウスおよびヒト由来のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素について実証された性質である。本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の由来はマウスおよびヒト由来のものに限定されるものではなく、同型のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が他の哺乳類の組織に存在し、かつ、それらのO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が互いに高度の相同性を有していることは当業者に容易に理解される。

このようなO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素は、上記した基質特異性及び基質選択性を有することを特徴とするものであり、すべて本発明の範囲に属するものである。

このような酵素としては、哺乳類組織由来の天然型酵素やその変異体、または以下の実施例で作製したようなO-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒し、遺伝子組み換え技術により製造された細胞外分泌型蛋白質などを挙げることができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の一例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が挙げられる。

- (1) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列；又は
- (2) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

さらに、本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変又は修飾して得られるO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は全て本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。このような活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列の26～398または配列番号3に記載したアミノ酸配列の68～398により特定されるO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができる。また、配列表の配列番号1または配列番号3に記

載したアミノ酸配列の26～100前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号1または配列番号3に記載したアミノ酸配列の101～398の領域をO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

一方、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

上記した作用及び基質特異性は、本明細書に記載した実施例で取得されたヒトおよびマウス由来の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素について実証された性質である。本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の由来はヒトまたはマウス由来のものに限定されるものではなく、同型の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が他の哺乳類の組織に存在し、かつ、それらの β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が互いに高度の相同性を有していることは当業者に容易に理解される。

このような β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、上記した作用および基質特異性を有することを特徴とするものであり、すべて本発明の範囲に属するものである。

このような酵素としては、哺乳類組織由来の天然型酵素やその変異体、または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒し、遺伝子組み換え技術により製造された細胞外分泌型蛋白質などを挙げることができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の一例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が挙げられる。

- (1) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列；又は
- (2) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

さらに、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変又は修飾して得られる β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は全て本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。このような活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号5に記載したアミノ酸配列の33～529により特定される β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができ

る。また、配列表の配列番号 5 に記載したアミノ酸配列の 31～200 前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号 1 に記載したアミノ酸配列の 201～529 の領域を β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

同様に、活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号 7 に記載したアミノ酸配列の 31～524 により特定される β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができる。また、配列表の配列番号 7 に記載したアミノ酸配列の 31～200 前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号 7 に記載したアミノ酸配列の 201～524 の領域を β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 33～529 から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 33～529 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 31～524 から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 31～524 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加

を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本発明の酵素又は蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1から8に記載したアミノ酸配列および塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて適当なcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の酵素をコードするDNAを取得することができる。

例えば、配列番号1および配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードするcDNA、並びに配列番号5および配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAを単離する方法は以下の実施例に詳細に説明されている。もっとも、本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAの単離方法はこれらの方法に限定されることはなく、当業者は下記の実施例に記載された方法を参照しつつ、この方法を適宜修飾ないし変更することにより、容易に目的のcDNAを単離することができる。

また、本発明の酵素をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の酵素をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の酵素を産生することができる。発

現系での発現については本明細書中後記する。

さらに、本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan α 2,8-シアル酸転移または β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質も本発明に含まれる。

本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素および β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素は、発現後に細胞内に留まり、細胞外に分泌されない場合がある。また、細胞内濃度が一定以上になると、酵素の発現量が低下するという可能性がある。上記のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素のO-glycan α 2,8-シアル酸転移活性および β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移活性を有効に利用するために、本酵素の活性を維持し、かつ発現時に細胞から分泌される可溶性形態の蛋白を製造することができる。このような蛋白としては、本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の活性に関与するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan α 2,8-シアル酸転移または β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移を触媒する蛋白質を挙げるができる。例えば、マウス免疫グロブリンIgMのシグナルペプチドや、プロテインAとの融合蛋白は本発明の分泌型蛋白の好ましい態様である。

これまでにクローニングされたシアル酸転移酵素は、他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有している。すなわち、NH₂末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム(stem)領域、及びCOOH-末端の大きな活性ドメインを有する(Paulson, J. C. and Colley, K. J., *J. Biol. Chem.*, 264, 17615-17618, 1989)。本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の

経膜ドメインの位置を調べるためには、カイト及びドゥーリトル (Kyte, J. and Doolittle, R.F., *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132, 1982) の方法に従って作成した疎水性分布図を利用することができる。また、活性ドメイン部分の推定には、各種のフラグメントを導入した組換えプラスミドを作成して利用することができる。このような方法の一例は、例えば PCT/JP94/02182 号の明細書に詳細に記載されているが、経膜ドメインの位置の確認や活性ドメイン部分の推定方法は、この方法に限定されることはない。

O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白の製造のためには、例えばシグナルペプチドとして免疫グロブリンシグナルペプチド配列を用い、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインに対応する配列を該シグナルペプチドにインフレーム融合させればよい。このような方法としては、例えば、ジョブリンの方法 (Jobling, S.A. and Gehrke, L., *Nature* (Lond.), 325, 622-625, 1987) を利用することができる。また、本明細書の実施例に詳細に説明されているように、マウス免疫グロブリン IgM のシグナルペプチドやプロテイン A との融合蛋白を製造してもよい。もっとも、シグナルペプチドの種類やシグナルペプチドと活性ドメインの結合方法、または可溶化の方法は上記方法に限定されることはなく、当業者は、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分を適宜選択することができるし、それらを利用可能な任意のシグナルペプチドと適宜の方法により結合することにより細胞外分泌型の蛋白を製造することができる。

(2) 本発明の遺伝子

本発明によれば、本発明の O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子、並びに β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素のア

ミノ酸配列をコードする遺伝子が提供される。

本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列；

(4) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

本発明の β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番目で特定される塩基配列；又は

(4) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番

目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本明細書で言う「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

さらに、本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインから成る蛋白質、並びに該活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であつて、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子も本発明の範囲に属する。

本発明の遺伝子の取得方法は上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明の遺伝子は適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター

(例えばプラスミド等)でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明の遺伝子は、転写に必要な要素(例えば、プロモーター等)が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子(*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp* 若しくは *tac* プロモータなどが挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1(メタロチオネイン遺伝子)プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは

t p i Aプロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはT P I 1ターミネータ若しくはA D H 3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばS V 4 0またはアデノウイルス 5 E 1 b 領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばS V 4 0エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルス V A R N A をコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはS V 4 0複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)またはシゾサッカロマイセス・ポンベT P I 遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

(4) 本発明の形質転換体及びそれを用いた蛋白質の製造

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual* ; 及び *カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)* 等に記載）。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス

(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である S f 9、S f 2 1 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である H i F i v e (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の酵素を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の酵素が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1 : O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素

本発明の具体例に用いた試薬、試料類は以下の通りである。Fetuin, asialofetuin, bovine submaxillary mucin (BSM), α 1-acid glycoprotein, ovomucoid, lactosyl ceramide (LacCer), GM3, GM1a, GD1a, GD1b, GT1b, CMP-NeuAc, 6'-sialyllactose, 3'-sialyl-*N*-acetyllactosamine, Triton CF-54 は Sigma 社から購入した。3'-sialyllactose, 6'-sialyl-*N*-acetyllactosamine は Calbiochem 社から購入した。*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc), GM4, Gal, *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) は和光純薬から購入した。GD3 は雪印乳業から購入した。GQ1b は Alexis Biochemicals 社から購入した。CMP-[14 C]-NeuAc (12.0 GBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。シアリダーゼ (NANase II, III) は Glyko Inc 社から購入した。*N*-glycanase (Glycopeptidase F) は宝酒造から購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は NEN 社から購入した。ヒト Multiple tissue cDNA panel は Clontech 社から購入した。GM1b, およびその positional analog である GSC-68, 2,3-sialylparagloboside (2,3-SPG), 2,6-sialylparagloboside (2,6-SPG) は木曾真教授 (岐阜大学農学部) から、NeuAc α 2,3Gal, NeuAc α 2,6Gal は石田秀樹博士 (野口研究所) から寄贈されたものを使用した。抗 GD3 モノクローナル抗体 KM641 は協和発酵、設楽研也、花井陳雄両博士から寄贈されたものを使用した。また抗 NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal 抗体 S2-566 は生化学工業より購入した。Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG+IgM(H+L) は Jackson Immno Research 社から購入した。BSM, α 1-acid glycoprotein, ovomucoid の脱シアル化 (アシアロ) 糖タンパク質は、これらを 0.02N HCl 中 80 度、1 時間で処理することにより調製した。

マウスシアル酸転移酵素 ST8Sia V のアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンを National Center for Biotechnology Information の expressed sequence tag (dbEST) のデータベースで検索したところ、GenBankTM accession Nos. BE633149, BE686184, BF730564 の各クローンが得られた。これらの塩基配列情報をもとに 2 種類の合成 DNA,

5'-CTTTTCTGGAGAACTAAAGG-3' (図 1 A の塩基番号 1001-1020 に相当) (配列番号 9), 5'-AATTGCAGTTTGAGGATTCC-3' (図 1 A の塩基番号 1232-1251 の相補鎖に相当) (配列番号 10) を作製し、Israel の方法に従い (Israel, D. I. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 2627-2631)、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を利用してマウス脳および心臓の各 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、新規シアル酸転移酵素の一部をコードしているクローンがそれぞれの cDNA ライブラリーから 1 個ずつ得られた。全長クローンを得るため、さらに 2 種類の合成 DNA, 5'-TGGCTCAGGATGAGATCGGG-3' (図 1 A の塩基番号 68-87 に相当) (配列番号 11), 5'-TACTAGCGCTCCCTGTGATTGG-3' (図 1 A の塩基番号 725-746 の相補鎖に相当) (配列番号 12) を作製し、マウス腎臓由来 cDNA を鋳型として PCR 法により両合成 DNA 間部分の DNA を増幅した。この増幅断片とマウス脳 cDNA ライブラリーから得られたクローンを連結することにより、全長クローンを得た。この cDNA は 398 アミノ酸からなる予測分子量 45,399 の II 型膜タンパク質をコードする単一の翻訳領域を有していた。またそのアミノ酸配列にはシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフが存在していた。本タンパク質は既知マウスシアル酸転移酵素の中では ST8Sia I, V とそれぞれアミノ酸配列レベルで 42.0%, 38.3% の相同性を示した (図 2 A)。なお以下に示すようにこのタンパク質は α 2,8-シアル酸転移酵素活性を有していたことから、これを本発明の *O*-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素 ST8Sia VI と命名した。

一方、他の哺乳動物においてもこれと同様の酵素が存在するのかを調べるため、マウス ST8Sia VI の配列情報を利用して、上記と同様にデータベースを検索したところ、ヒトやラットにも同様の酵素が存在することが確認できた。図 1 B にヒトの ST8Sia VI の配列情報を示す。マウスとヒトの ST8Sia VI ではアミノ酸配列レベルで 82.4% の相同性を示した (図 2 B)。

つぎに ST8Sia VI の酵素学的諸性質を調べるため、分泌型タンパク質の製造を行った。まずマウス ST8Sia VI について、それぞれ *Xho*I サイトを含む 2 種類の合成 DNA, 5'-TGCTCTCGAGCCCAGCCGACGCGCTGCCC-3' (図 1 A の塩基番号 141-170 に

相当) (配列番号 1 3), 5'-TATTCTCGAGCTAAGAAACGTTAAGCCGTT-3' (図 1 A の塩基番号 1263-1293 の相補鎖に相当) (配列番号 1 4) を用い、クローニングした全長 cDNA を鋳型として PCR 法により、マウス ST8Sia VI の活性ドメインをコードする DNA 断片を増幅した。これを *Xho*I で切断後、哺乳動物発現ベクター pcDSA の *Xho*I サイトに挿入した。この発現ベクターを pcDSA-mST8Sia VI と命名した。

またヒト ST8Sia VI については、まず Human Tumor Multiple Tissue cDNA Panels (Clontech) の Colon adenocarcinoma CX-1 由来 cDNA を鋳型として、2 種類の合成 DNA, 5'-CAATTGACATATCTGAATGAGAAGTCGCTC-3' (図 1 B の塩基番号 293-315 に相当) (配列番号 1 5), 5'-TACTAACATCTCCTGTGGTTGG-3' (図 1 B の塩基番号 740-761 の相補鎖に相当) (配列番号 1 6) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片、および 2 種類の合成 DNA, 5'-CCAGTGTCCCAGCCTTTTGT-3' (図 1 B の塩基番号 608-627 に相当) (配列番号 1 7), 5'-TGAGTGGGGAAGCTTTGGTC-3' (図 1 B の塩基番号 1407-1426 の相補鎖に相当) (配列番号 1 8) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、両増幅 DNA 断片が共通に有する *Eco*RI サイトを利用して連結し、ヒト ST8Sia VI の活性ドメインをコードする DNA 断片を得た。これをクローニングベクター pBluescript II SK(+) の *Eco*RV サイトに挿入した後、*Mun*I と *Xho*I で切り出し、この切り出し断片を pcDSA の *Eco*RI-*Xho*I サイトに挿入したものを、発現ベクター pcDSA-hST8Sia VI と命名した。

pcDSA-mST8Sia VI および pcDSA-hST8Sia VI は、それぞれマウス免疫グロブリン IgM のシグナルペプチドと *Staphylococcus aureus* protein A, およびマウスまたはヒト ST8Sia VI の活性ドメイン(マウス ST8Sia VI ではアミノ酸番号 26-398、ヒト ST8Sia VI ではアミノ酸番号 68-398)からなる分泌型融合タンパク質をコードする。

各発現ベクターとリポフェクトアミン(Invitrogen)を用いて COS-7 細胞でその一過性発現を行った(Kojima, N. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 360, 1-4)。ここでそれぞれの発現ベクターを導入した細胞から細胞外に分泌された本発明のタンパク質を PA-mST8Sia VI (マウス)および PA-hST8Sia VI (ヒト)と命名した。

PA-mST8Sia VI、PA-hST8Sia VI は IgG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech 社) に吸着させて培地より回収した。シアル酸転移酵素活性は Lee らの方法に準じて以下のように行った (Lee, Y.-C. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 11958-11967)。50 mM MES バッファー (pH 6.0), 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5% Triton CF-54, 100 μ M CMP-[¹⁴C]-NeuAc, 糖鎖 (糖脂質の場合は 0.5 mg/ml, 糖タンパク質、オリゴ糖は 1 mg/ml になるように添加)、および PA-mST8Sia VI または PA-hST8Sia VI 懸濁液を含む反応液 (10 μ l) を 37 度で 3-20 時間インキュベートし、その後、糖脂質については C-18 カラム (Sep-Pak Vac 100 mg; Waters 社) を用いて精製したものを試料として、オリゴ糖、糖タンパク質については反応産物をそのまま試料として解析を行った。オリゴ糖、糖脂質はシリカゲル 60HPTLC プレート (Merck 社) にスポットし、エタノール:ピリジン:n-ブタノール:水:酢酸=100:10:10:30:3 の展開溶媒 (オリゴ糖用)、または 1-プロパノール:アンモニア水:水=6:1:2.5 の展開溶媒 (オリゴ糖用)、またはクロロホルム:メタノール:0.02% CaCl₂=55:45:10 の展開溶媒 (糖脂質用) で展開した。糖タンパク質の場合は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析を行った。これらの放射活性を BAS2000 ラジオイメージアナライザー (フジフィルム) で可視化し、定量した。

表 1 に PA-mST8Sia VI、PA-hST8Sia VI の基質特異性を示す。

表 1 ST8Sia VI の受容体基質特異性

PA-mST8Sia VI および PA-hST8Sia VI を用いて様々な受容体基質に対する特異性を検討した。各基質の濃度は、糖脂質の場合は 0.5 mg/ml に、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖の場合は 1 mg/ml になるようにした。相対活性は Fetuin の取り込み値 PA-mST8Sia VI は 2.06 pmol/h/(ml 酵素液)、PA-hST8Sia VI は 0.204 pmol/h/(ml 酵素液) を 100 とし計算した。R は N 型糖鎖の残りの糖鎖部分を意味する。ND : 測定せず。

| Acceptor | Representative structures of carbohydrates | Relative rate (%) | |
|------------------------------|---|--------------------|--------------------|
| | | Mouse ST8Sia VI | Human ST8Sia VI |
| Glycoproteins | | | |
| Fetuin | NeuAca2,3Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Thr | 100 | 100 |
| | NeuAca2,3Galβ1,3(NeuAca2,6)GalNAc-O-Ser/Thr | | |
| | NeuAca2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R | | |
| Asialofetuin | | | |
| α1-Acid glycoprotein | NeuAca2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R | 0 | 0 |
| Asialo- α1-Acid glycoprotein | | 0 | 0 |
| BSM | NeuAca2,6GalNAc-O-Ser/Thr | 375 | 24.2 |
| | GlcNAcβ1,3(NeuAca2,6)GalNAc-O-Ser/Thr | | |
| Asialo-BSM | | 0 | 0 |
| Ovomucoid | NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAc-R | 6.2 | 12.3 |
| Asialoovomucoid | | 0 | 0 |
| Glycolipids | | | |
| Lactosylceramide | Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | ND |
| GM4 | NeuAca2,3Galβ1-Cer | 1.0 | ND |
| GM3 | NeuAca2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer | 13.0 | 1.6 |
| GM1a | Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | ND |
| GD1a | NeuAca2,3Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer | 6.0 | 1.8 |
| GD3 | NeuAca2,8NeuAca2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| GD1b | Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,8NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | ND |
| GT1b | NeuAca2,8Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,8NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer | 1.1 | 2.2 |
| GQ1b | NeuAca2,8NeuAca2,8Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,8NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| GM1b | NeuAca2,3Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer | 1.0 | ND |
| GSC-68 | NeuAca2,6Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer | 2.6 | ND |
| 2,3-SPG | NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer | 3.5 | ND |
| 2,6-SPG | NeuAca2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0.98 | ND |

| Monosaccharides and oligosaccharides | | | |
|--------------------------------------|---|------|------|
| 3'-Sialyllactose | NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc | 629 | 69.9 |
| 6'-Sialyllactose | NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc | 91.5 | 10.7 |
| 3'-Sialyl-N-acetyllactosamine | NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc | 411 | ND |
| 6'-Sialyl-N-acetyllactosamine | NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc | 88.7 | ND |
| 3'-Sialylgalactose | NeuAc α 2,3Gal | 13.9 | ND |
| 6'-Sialylgalactose | NeuAc α 2,6Gal | 2.0 | ND |
| N-Acetylneuraminic acid | NeuAc | 0 | ND |
| Galactose | Gal | 0 | ND |
| N-Acetylgalactosamine | GalNAc | 0 | ND |

PA-mST8Sia VI は GM4, GM3, GD1a, GT1b, GM1b, GSC-68, 2,3-SPG, 2,6-SPG など、非還元末端に NeuAc α 2,3(6)Gal- という構造をもつ糖脂質に対して活性を示した。このうち GM3 を基質とした場合、その反応産物は α 2,3-, α 2,6-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ (NANase II) では導入シアル酸が切断されなかったが、 α 2,3-, α 2,6-, α 2,8-, α 2,9-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ (NANase III) では、導入シアル酸が切断された (図 3 A)。またこの反応産物は抗 GD3 モノクローナル抗体 KM641 を用いた TLC 免疫染色 (Saito, M. *et al.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 230-235) によって α 2,8 結合を介してシアル酸が導入された GD3 であることが確認されたことから (図 3 B)、PA-mST8Sia VI はシアル酸を α 2,8-の結合様式で転移することが明らかになった。

一方、糖タンパク質を基質とした場合 (表 1)、PA-mST8Sia VI は O 型糖鎖のみを含有する BSM に対して最も高い活性を示した。O 型糖鎖、N 型糖鎖を含有する Fetuin、N 型糖鎖のみを含有する Ovomucoid に対しても活性を示したが、Ovomucoid に対する活性は O 型糖鎖を含むタンパク質に比べると低かった。なお、PA-mST8Sia VI はアシアロ糖タンパク質に対しては全く活性を示さなかった。また単糖およびオリゴ糖を基質とした実験により (表 1)、PA-mST8Sia VI が基質として認識する最小糖鎖単位は NeuAc α 2,3(6)Gal であることが明らかになった。

Fetuin を基質としたとき、PA-mST8Sia VI によってあらたに導入されたシアル酸の大部分は O 型糖鎖に取り込まれていることが N-glycanase 処理によって明らかになった (図 4)。すなわち PA-mST8Sia VI を用いて Fetuin を [14 C]-NeuAc でシアル化し、これを N 型糖鎖をペプチド部分から遊離する N-glycanase で処理すると、大部分 (82.7%) の放射能活性はこの Fetuin に保持されたままであった。このことは PA-mST8Sia VI によって導入されたシアル酸の大部分は O 型糖鎖に取り込まれたことを示す。一方、N 型糖鎖を受容体基質とするマウス ST8Sia III を用いて同様の実験を行ったところ、放射活性は完全に消失した。

さらに PA-mST8Sia VI の基質特異性および選択性を明らかにするため、BSM と

GM3 に対する K_m 値、 V_{max} 値を求めた。BSM に対しては K_m 値=0.03 mM, V_{max} 値=23.8 pmol/h/(ml 酵素液)で、 V_{max}/K_m 値は 793 であった。一方、GM3 に対しては K_m 値=0.5 mM, V_{max} 値=0.67pmol/h/(ml 酵素液)で、 V_{max}/K_m 値は 1.34 であった。以上の結果は、PA-mST8Sia VI にとって O 型糖鎖が糖脂質や N 型糖鎖よりはるかに好ましい基質であることを示している。

上記の酵素学的諸性質については、活性値に多少の差はあるものの PA-hST8Sia VI についても当てはまることから(表 1、図 3 A、図 4)、各種動物由来の ST8Sia VI が従来の α 2,8-シアル酸転移酵素とは異なる基質特異性を有することが示されたといえる。

またマウス ST8Sia VI については、その全長クローンの細胞内における酵素活性についても調べた(図 5)。マウス ST8Sia VI の全長をコードする領域を含む 1.4 kb の *NotI*-*ApaI* 断片を、発現ベクター pRc/CMV の *NotI*-*ApaI* サイトに挿入したものを pRc/CMV-ST8Sia VI と命名し、これをリポフェクトアミンを用いて COS-7 細胞に導入した。この細胞よりガングリオシドを抽出し、NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal 構造を認識するモノクローナル抗体 S2-566 を用いて TLC 免疫染色を行ったところ(図 5 A)、pRc/CMV-ST8Sia VI 導入細胞において有意に NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal 構造を有するガングリオシド量が増加していたことが明らかになった。また細胞内の糖タンパク質についても、pRc/CMV-ST8Sia VI 導入細胞では O 型糖鎖上に新たに NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal 構造が形成されていた(図 5 B)。以上の結果は、マウス ST8Sia VI が生体内において α 2,8-シアル酸転移酵素として機能していることを示している。

なお、マウス ST8Sia VI は腎臓、心臓、脾臓などで主に発現しているが(図 6 A)、ヒト ST8Sia VI は胎盤や胎児の各種臓器、および各種腫瘍細胞などにおいて主に発現している(図 6 B)。

実施例 2 : β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素

本発明の具体例に用いた試薬、試料類は以下の通りである。Fetuin,

asialofetuin, bovine submaxillary mucin (BSM), α 1-acid glycoprotein, ovomucoid, lactosyl ceramide (LacCer), GA1, GM3, GM1a, Gal β 1,3GalNAc, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,4GlcNAc, Triton CF-54, β -ガラクトシダーゼ (牛精巢由来) は Sigma 社から購入した。Paragloboside, ラクトースは和光純薬から購入した。CMP-[14 C]-NeuAc (12.0 GBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。Lacto-*N*-tetraose, Lacto-*N*-neotetraose, シアリダーゼ (NANase I, II) は Glyko Inc 社から購入した。[α - 32 P]dCTP は NEN 社から購入した。ヒトおよびマウス Multiple tissue cDNA panel は Clontech 社から購入した。BSM, α 1-acid glycoprotein, ovomucoid の脱シアル化 (アシアロ) 糖タンパク質は、これらを 0.02N HCl 中 80 度、1 時間で処理することにより調製した。

ヒトシアル酸転移酵素 ST6Gal I のアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンを National Center for Biotechnology Information の expressed sequence tag (dbEST) のデータベースで検索したところ、GenBank™ accession Nos. BE613250, BE612797, BF038052 の各 EST クローンが得られた。これらについては I. M. A. G. E. Consortium より該当クローンを入手した。またそれらの塩基配列情報を利用して、さらに dbEST とヒトゲノムの High throughput genomic sequence のデータベースを検索したところ、関連 EST クローンとゲノム遺伝子の塩基配列情報が得られた (Accession Nos. H94068, AA514734, BF839115, AA210926, AA385852, H94143, BF351512 (以上 EST クローン), AC016994 (ゲノム配列))。以上の塩基配列情報をもとにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 用のプライマーを作製し、ヒト大腸由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、ここで得られた増幅断片と入手 EST クローン由来の DNA 断片を連結することによって翻訳領域全長を含むクローンを得た (図 7 A)。この cDNA は 529 アミノ酸からなる予測分子量 60,157 の II 型膜タンパク質をコードする単一の翻訳領域を有していた。なお膜貫通ドメインは疎水性分布図によりアミノ酸番号 12-30 の領域に存在することが予測された (図 7 B)。本タンパク質のアミノ酸配列にはシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフが存在してい

た。また本タンパク質は既知ヒトシアル酸転移酵素の中では ST6Gal I とアミノ酸レベルで最も高い相同性 (48.9%) を示したが (図 9 A)、他のファミリーのシアル酸転移酵素とは 21-36% 程度の相同性を示したに過ぎなかった。なお以下に示すようにこのタンパク質は β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有していたことから、これを本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素 ST6Gal II と命名した。またヒト ST6Gal II には、splicing variant と考えられるシアリルモチーフ S の途中から配列が異なる short form のクローンも存在していた (図 7 A)。

一方、他の哺乳動物においてもこれと同様の酵素が存在するのかを調べるため、ヒト ST6Gal II の配列情報を利用して、上記と同様にデータベースを検索したところ、マウスにも同様の酵素が存在することが確認できた。そこでマウスのクローンについてもクローニングを行うことにした。マウス 14 日目胎児由来 cDNA を鋳型として、2 種類の合成 DNA, 5'-GACAATGGGGATGAGTTTTTTACATCCCAG-3' (図 8 A の塩基番号 321-350 に相当) (配列番号 19), 5'-CGATTTCCTCCCCCAAGGAGGAGTTCAGG-3' (図 8 A の塩基番号 864-893 の相補鎖に相当) (配列番号 20) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片、および 2 種類の合成 DNA, 5'-ACGTTGGACGGCAGAGAGGCGCCCTTCTCG-3' (図 8 A の塩基番号 774-803 に相当) (配列番号 21), 5'-ACCTTATTGCACATCAGTTCCCAAGAGTTC-3' (図 8 A の塩基番号 1582-1611 の相補鎖に相当) (配列番号 22) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、両増幅 DNA 断片が共通に有する *Kpn*I サイトを利用して連結し、さらにこれに 2 種類の合成 DNA, 5'-CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGAC-3' (図 8 A の塩基番号 1-30 に相当) (配列番号 23), 5'-CGCAACAAAAAATAGCTATCTTCCTCGGG-3' (図 8 A の塩基番号 381-410 の相補鎖に相当) (配列番号 24) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、両 DNA 断片が共通に有する *Aor*51HI サイトを利用して連結して、マウス ST6Gal II の全長をコードする DNA 断片を得、クローニングベクター pBluescript II SK(+) に挿入した。図 8 A にマウスの ST6Gal II の配列情報を示す。マウス ST6Gal II は 524 ア

ミノ酸からなり、ヒト ST6Gal II より 5 アミノ酸ほどステム領域に相当する部分が短かった。なお本タンパク質の膜貫通ドメインは、疎水性分布図によりアミノ酸番号 12-30 の領域に存在することが予測された (図 8 B)。ヒトとマウスの ST6Gal II ではアミノ酸配列レベルで 77.1%の相同性を示した (図 9 B)。

つぎに ST6Gal II の酵素学的諸性質を調べるため、分泌型タンパク質の製造を行った。まずヒト ST6Gal II について、*Xho*I サイトを含む合成 DNA, 5'-TCATCTACTTCACCTCGAGCAACCCGCTG-3' (図 7 A の塩基番号 255-284 に相当) (配列番号 25) を用いて膜貫通ドメイン直下流に *Xho*I サイトを導入し、これと pBluescript II SK(+) 由来の *Xho*I サイトを用いて ST6Gal II のステム領域と活性ドメインをコードする *Xho*I 断片を調製した。これを哺乳動物発現ベクター pcDSA の *Xho*I サイトに挿入した。この発現ベクターを pcDSA-hST6Gal II と命名した。またマウス ST6Gal II については、上記クローニングの際に用いた合成 DNA, 5'-CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGAC-3' (図 8 A の塩基番号 1-30 に相当) (配列番号 23) のかわりに、*Mun*I サイトを含む合成 DNA, 5'-CATCCAATTGACCAACAGCAATCCTGCGGC-3' (図 8 A の塩基番号 83-112 に相当) (配列番号 26) を用いてマウス ST6Gal II のステム領域と活性ドメインをコードする *Mun*I-*Xho*I 断片を調製した。これを pcDSA の *Eco*RI-*Xho*I サイトに挿入したものを、発現ベクター pcDSA-mST6Gal II と命名した。

pcDSA-hST6Gal II および pcDSA-mST6Gal II は、それぞれマウス免疫グロブリン IgM のシグナルペプチドと *Staphylococcus aureus* protein A, およびマウスまたはヒト ST6Gal II の活性ドメイン (ヒト ST6Gal II ではアミノ酸番号 33-529、マウス ST6Gal II ではアミノ酸番号 31-524) からなる分泌型融合タンパク質をコードする。

各発現ベクターとリポフェクトアミン (Invitrogen) を用いて COS-7 細胞でその一過性発現を行った (Kojima, N. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 360, 1-4)。ここでそれぞれの発現ベクターを導入した細胞から細胞外に分泌された本発明のタンパク質を PA-hST6Gal II (ヒト) および PA-mST6Gal II (マウス) と命名した。

PA-hST6Gal II、PA-mST6Gal II は IgG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech 社) に吸着させて培地より回収した。シアル酸転移酵素活性は Lee らの方法に準じて以下のように行った (Lee, Y.-C. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 11958-11967)。50 mM MES バッファー (pH 6.0), 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5% Triton CF-54, 100 μ M CMP-[¹⁴C]-NeuAc, 基質糖鎖 (糖脂質の場合は 0.5 mg/ml, 糖タンパク質、オリゴ糖は 1 mg/ml になるように添加)、および PA-hST6Gal II または PA-mST6Gal II 懸濁液を含む反応液 (10 μ l) を 37 度で 3-20 時間インキュベートし、その後、糖脂質については C-18 カラム (Sep-Pak Vac 100 mg; Waters 社) を用いて精製したものを試料として、オリゴ糖、糖タンパク質については反応産物をそのまま試料として解析を行った。オリゴ糖、糖脂質はシリカゲル 60HPTLC プレート (Merck 社) にスポットし、1-プロパノール : アンモニア水 : 水 = 6:1:2.5 の展開溶媒 (オリゴ糖用) またはクロロホルム : メタノール : 0.02% CaCl₂ = 55:45:10 の展開溶媒 (糖脂質用) で展開した。糖タンパク質の場合は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析を行った。これらの放射活性を BAS2000 ラジオイメージアナライザー (フジフィルム) で可視化し、定量した。

表 2 に PA-hST6Gal II、PA-mST6Gal II の基質特異性を示す。

表 2 ST6Gal II の基質特異性

PA-hST6Gal II および PA-mST6Gal II を用いて様々な基質に対する特異性を検討した。各基質の濃度は、糖脂質の場合は 0.5 mg/ml に、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖の場合は 1 mg/ml になるようにした。相対活性は Galβ1,4GlcNAc の取り込み値を 100 として計算した。R は N 型糖鎖の残りの糖鎖部分を意味する。

| Acceptors | Representative structures of carbohydrates | Relative rate (%) | |
|-----------------------------|--|--------------------|---|
| | | Mouse ST6Gal II | Human ST6Gal II Human ST6Gal I |
| Oligosaccharides | | | |
| Type II | Galβ1,4GlcNAc | 100* | 100** |
| Type I | Galβ1,3GlcNAc | 0 | 0 |
| Type III | Galβ1,3GalNAc | 0 | 0 |
| Lactose | Galβ1,4Glc | 0 | 0 |
| Lacto-N-tetraose | Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc | 0 | 0 |
| Lacto-N-neotetraose | Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc | 128.8 | 86.2 |
| Glycoproteins | | | |
| Fetuin | NeuAcα2,3Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Thr | 0 | 0 |
| | NeuAcα2,3Galβ1,3(NeuAcα2,6)GalNAc-O-Ser/Thr | | 13.0 |
| | NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R | | |
| Asialofetuin | | | |
| BSM | NeuAcα2,6GalNAc-O-Ser/Thr | 21.0 | 3.9 |
| | GlcNAcβ1,3(NeuAcα2,6)GalNAc-O-Ser/Thr | 0 | 0 |
| Asialo-BSM | | | |
| Ovomucoid | NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc-R | 0 | 0 |
| Asialoovomucoid | | | |
| α1-Acid glycoprotein | NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R | 0 | 0 |
| Asialo-α1-Acid glycoprotein | | 0.75 | 1.2 |
| | | 12.3 | 1.2 |
| Glycolipids | | | |
| Lactosylceramide | Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| GA1 | Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| GM1a | Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAcα2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| GM3 | NeuAcα2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| Paragloboside | Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer | 0 | 0 |
| | | | 0.3 |

*, 2.74 pmol/h/ml medium. **, 1.03 pmol/h/ml medium. ***, 8.14 pmol/h/ml medium. NeuAc, N-acetylneuraminic acid. Cer, ceramide.

両酵素ともオリゴ糖に対しては、非還元末端に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつものに対してのみ活性を示した(図 10)。またこの構造を持つと考えられる糖タンパク質に対しても弱い活性を示した。一方、糖脂質については、調べた範囲内では両酵素の基質となるものはなかった。また比較のためにヒト ST6Gal I のオリゴ糖に対する活性を調べたところ、Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつオリゴ糖のほかに、Lactose や Lacto-*N*-tetraose などに対しても活性を示した(図 10)。また ST6Gal I は糖タンパク質や糖脂質に対しても広い活性を示した(表 2)。以上のことは ST6Gal II が ST6Gal I よりも基質特異性に関してより選択性が強いことを意味する。なおヒト ST6Gal II の splicing variant である short form のタンパク質については、酵素活性が認められなかった(図 10)。

PA-hST6Gal II および PA-mST6Gal II により Gal β 1, 4GlcNAc にシアル酸を転移した場合、その反応産物の導入シアル酸は ST6Gal I の場合と同様に α 2, 3-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase I)では切断されなかったが、 α 2, 3-, α 2, 6-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase II)では切断された(図 11 A)。またこの反応産物は TLC において 6'-sialyl-*N*-acetyllactosamine と同じ移動度を示したこと、さらにガラクトシダーゼ処理では TLC において移動度に変化が認められなかったことから(図 11 B)、 α 2, 6 結合を介してガラクトースにシアル酸が導入された 6'-sialyl-*N*-acetyllactosamine であると考えられた。以上により ST6Gal II はシアル酸を α 2, 6-の結合様式でガラクトースに転移することが明らかになった。なおその特に好ましい基質としては、非還元末端に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつオリゴ糖と考えられた。

またヒト ST6Gal I, ST6Gal II の様々な組織における発現パターンを、ST6Gal I 特異的プライマー (5'-TTATGATTCACACCAACCTGAAG-3' (配列番号 27) および 5'-CTTTGTACTTGTTTCATGCTTAGG-3' (配列番号 28)、PCR 増幅断片の大きさは 372 bp) と ST6Gal II 特異的プライマー (5'-AGACGTCATTTTGGTGGCCTGGG-3' (図 7 A の塩基番号 1264-1286 に相当) (配列番号 29) および 5'-TTAAGAGTGTGGAATGACTGG-3'

(図 7 A の塩基番号 1745-1765 に相当) (配列番号 30)、PCR 増幅断片の大きさは 502 bp) を用いて PCR 法で調べた (図 12 A)。ヒト ST6Gal I はほとんどの組織で発現していたが、ST6Gal II は小腸、大腸、胎児脳を除く組織での発現は非常に低いか、全く認められなかった。さらにヒト ST6Gal I は各種腫瘍細胞で発現していたが、ST6Gal II の発現は検出できなかった (図 12 B)。またマウス ST6Gal II の発現様式について、マウス ST6Gal II 特異的プライマー (5'-CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGAC-3' (図 8 A の塩基番号 1-30 に相当) (配列番号 23) および 5'-CGCAACAAAAAATAGCTATCTTCCTCGGG-3' (図 8 A の塩基番号 381-410 の相補鎖に相当) (配列番号 24)、PCR 増幅断片の大きさは 410 bp) を用いて同様に調べたところ、脳および胎生期でその発現が認められたが、その他の組織での発現は非常に低いか、全く認められなかった (図 12 C)。以上の結果は ST6Gal I と ST6Gal II が生体内で異なる役割を果たしていることを示唆する。

産業上の利用の可能性

本発明により新規酵素として O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素、および該酵素の活性部分を有し細胞外に分泌される新規蛋白質が提供される。本発明の酵素および蛋白質は、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素活性を有するので、例えば、蛋白にヒト型の糖鎖を導入する試薬として有用である。また、本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、ヒトに特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療のための医薬として有用である。さらに、本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染防止、炎症反応抑制、神経組織賦活作用を目的とする医薬としても用いることが可能である。さらにまた、本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、薬剤等にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための研究用試薬などとして有用である。

さらに本発明により新規酵素として β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素、および該酵素の活性部分を有し細胞外に分泌される新規蛋白質が提供される。本発明の酵素および蛋白質は β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素

活性を有するので、Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつオリゴ糖などのガラクトース上に α 2, 6 の結合様式でシアル酸をより選択的に導入することが可能になった。本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素 ST6Gal II は、本酵素が合成する特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療薬として、また癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させたり、糖鎖分解酵素の分解活性を阻害する研究用試薬などとして有用である。

請求の範囲

1. 以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素。

基質特異性：末端に Sia α 2,3(6)Gal（ここで、Sia はシアル酸を示し、Gal はガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

2. 下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

3. 請求項2に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードするO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子。

4. 下記の何れかの塩基配列を有する請求項3に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列；

(4) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285

番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

5. 請求項3または4に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。

6. 発現ベクターである、請求項5に記載の組み換えベクター。

7. 請求項5または6に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

8. 請求項7に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項1または2に記載の酵素を採取することを特徴とする、請求項1または2に記載の酵素の製造方法。

9. 下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

10. 請求項1または2に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋

白であって、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質。

1 1. 請求項 9 又は 1 0 に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

1 2. 請求項 1 1 に記載の遺伝子を含む組み換えベクター。

1 3. 発現ベクターである、請求項 1 2 に記載の組み換えベクター。

1 4. 請求項 1 2 または 1 3 に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

1 5. 請求項 1 4 に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項 9 または 1 0 に記載の蛋白質を採取することを特徴とする、請求項 9 または 1 0 に記載の蛋白質の製造方法。

1 6. 以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6 の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

1 7. 下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号 5 または 7 に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 5 または 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

1 8. 請求項 1 7 に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子。

1 9. 下記の何れかの塩基配列を有する請求項 1 8 に記載の β -ガラクトシ

ド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子。

(1) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番目で特定される塩基配列；又は

(4) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

20. 請求項18または19に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。

21. 発現ベクターである、請求項20に記載の組み換えベクター。

22. 請求項20または21に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

23. 請求項22に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項16または17に記載の酵素を採取することを特徴とする、請求項16または17に記載の酵素の製造方法。

24. 下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質。

(1) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加

を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

(3) 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号31～524から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号31～524から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

25. 請求項16または17に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質。

26. 請求項24又は25に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

27. 請求項26に記載の遺伝子を含む組み換えベクター。

28. 発現ベクターである、請求項27に記載の組み換えベクター。

29. 請求項27または28に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

30. 請求項29に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項24または25に記載の蛋白質を採取することを特徴とする、請求項24または25に記載の蛋白質の製造方法。

要約書

本発明によれば、新規な基質特異性および基質選択性を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素、並びに、新規な作用および基質特異性を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。本発明のシアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染防止、炎症反応抑制、神経組織賦活作用を目的とする医薬として用いることが可能である。

圖 1

A Mouse ST8Sia VI

| | |
|---|------|
| CGGAGCGCGAGTTCGGTGCCCGCCGGGTGCGCTTCGCCCCGGCAGCTTTGGCGGCGAGGACGCCCGTGCTCAGGATGAGATCGGGGGGCAACGCTGTTTC | 100 |
| M R S G G T L F | 8 |
| GCCCTCATAGGCAGCCTGATGCTGCTGCTCTCTCGCTATGCTCTGGTGCCACGCCGCTGCCCGCTCCAGGCTGTTGATGGGGAAGCAGAG | 200 |
| A L I G S L M L L L L L L R M L W C P A D A P A R S R L T M E G S S R E | 42 |
| AGGACACCAAGTGGTACCTCAGCTGCACTGAAGACACTCTGGAGCCCGACAAACCCCGGTACCACGCACCAGGAACAGCACAATATCTGGATGAGAAGACAAC | 300 |
| D T S G T S A A L K T L W S P T T P V P R T R N S T Y L D E K T T | 75 |
| CCAAATAACAGAGAAATGCAAAGATCTGCAATATAGCTTGAACCTCTTTATCTAACAAAACGAGACGGTACTCTGAGGATGACTACCTCCAGACCATCACA | 400 |
| Q I T E K C K D L Q Y S L A N S L S N K T R R Y S E D D Y L Q T I T | 108 |
| AACATACAGAGATGCCATGGAAACCGACAAGCAAGAATATGACAATTTAGAGCAAAAACCTGGCTTCTCTGTCGATGCCATTCAGACTTCGTTGGT | 500 |
| N I Q R C P W N R R Q A E E Y D N F R A K L A S C C D A I Q D F V V S | 142 |
| CCCAGAACAACTCCAGTGGGGACTAACATGAGCTACGAGGTGGAAAGCAAGAAACACATCCCCATTCGAGAGAACATTTCCACATGTTTCCAGTGTC | 600 |
| Q N N T P V G T N M S Y E V E S K K H I P I R E N I F H M F P V S | 175 |
| GCAGCCTTTTGAGACTATCCCTATAACCAAGTGTGCACTGGTTGGTAATGGGGGAATTTCTCAACAAGTCTCTCTCGGAGCAGAAAATTGATAAACTCGAC | 700 |
| Q P F V D Y P Y N Q C A V V G N G G I L N K S L C G A E I D K S D | 208 |
| TTCTCTTCAGGTGAACCTCCCCCAATCACAGGAGCGCTAGTAAGAATGTTGGAAGCAAAACAAATCTTGTCATGTCAATCCAGCATATAACCC | 800 |
| F V F R C N L P P I T G S A S K T G T G S K T N L V T V N P S I I T L | 242 |
| TGAAGTACCAGAAATTGAAGGAGAAAGACACAGTTTGGAGGACATCTCCACCTATGGAGATGCATTCTCTCTGCGAGCATTTTCTATCTGGGC | 900 |
| K Y Q N L K E K K A Q P L E D I S T Y G D A F L L L P A F S Y R A | 275 |
| CAACACAGGCATCTCTTTAAAGTCTACCAAACTCAAAGAGTCAAAAATGAGGCAAAAGGTTCTCTCTTCCATCCCAGGTACCTGAGACACCTCGCT | 1000 |
| N T G I S F K V Y Q T L K E S K M R Q K V L F F H P R Y L R H L A | 308 |
| CTTTTGGGAGAACTAAAGGGGTGACTGCATACCGCTTGCTCCACGGCTTGATGATGCAAGTGTGCTGTGGAAGTGTGAAACAGTGAAGCTCTACG | 1100 |
| L F W R T K G V T A Y R L S T G L M I A S V A V E L C E N V K L Y G | 342 |
| GATTCTGGCCTTTCTCTAAGACTATCGAAGACACCCCACTCAGTCAACCTACTATGATAACATGTTACCTAAGCATGGTTTCCACCAGATGCCTTAAAGA | 1200 |
| _ F _ W _ P _ F S K T I E D T P L S H H Y Y D N M L P K H G F H Q M P K E | 375 |
| ATACAGCCAAATGCTCCAGCTCCATATGAGAGGAATCCTCAAACGCAATTCAGCAAAATGTGAAACGGCTTAACGTTTCTTAGAAGGAGAATAATTTAG | 1300 |
| Y S Q M L Q L H M R G I L K L Q F S K C E T A * | 398 |
| GAGGTGGAGTGGATGTGTCACAGCATCTCCAAAAAGCCAATAGAAGAAGGCACAGAGAAAGCATGAATTACAAAAGCGCTCTCCCACTTGCTAGACCAA | 1400 |
| AGGCCACCGCCCACTCACTTTGCAGCCTCCAGAGTCACTCACTACCTTCAACGCTTCTTCTGAGAAATAGAGACAAAACATCAGACTTGGAT | 1500 |

B Human ST8Sia VI

| | |
|--|------|
| GGTGGCGCGCGCGCGGAGCCGCGAGTCGGGGCCGCCCGGGCTGTGCTTCGCCCCGGCAGCAGCGGTGGCGCGCGCCCTGTGGCTCAGGATGCGGCCGG | 100 |
| M R P | 3 |
| GGGGCGCAGCTGCTCGCCCTGCTCGCCAGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCCTGCTCTGGTGCCCGGCAGACGCGCCCGCGCGCCAGGATTTCTGG | 200 |
| G G A L L L A L L A S L L L L L L L L R L L W C P A D A P G G R A R I L V | 37 |
| TGGAGGAAAGCAGGGAGGCCACCCACGGCACCCCCGAGCGCTGAGGACGCTCCGGAGCCCGCGCAGCCGGTACCAGCGCGCCACTAACAGCACATATCT | 300 |
| E E S R E A T H G T P A A L R T L R S P A T A V P R A T N S T Y L | 70 |
| GAATGAGAAGTCGCTCCAACTGACGGAGAAATGCAAAATCTGCAATATGGCATTGAGTCTTTCTCTAACAAAACGAAAGGGTATTCAGAGAACGACTAC | 400 |
| N E K S L Q L T E K C K N L Q Y G I E S F S N K T K G Y S E N D Y | 103 |
| CTTCAGATTATACAGAGATTCGTCCTGCGAAACGGCAAGCAAGAATAATGCAAAATTTAGAGCCAAACTTGCTTCTCGTGTGATGCTGTCTC | 500 |
| L Q I I T D I Q S C P W K R Q A E E Y A N F R A K L A S C D A V Q | 137 |
| AAAACCTTGTTGTTTCTCAGAATAACAACCTCCAGTTGGGACTAATATGAGTTACGAGGTGGAAGCAAAAAAGAAATCCCAATTAAGAAGAACATTTTTC | 600 |
| N F V V S Q N N T P V G T N M S Y E V E S K K E I P I K K N I F H | 170 |
| TATGTTTCCAGTGTCCAGCCTTTTGTGGACTACCTTTATAATCAGTGTGCGAGTGGTCGGAATGGGGGAATTTCTGAATAAGTCTCTCTGTGGAACGTAA | 700 |
| M F P V S Q P F V D Y P Y N Q C A V V G N G G I L N K S L C G T E | 203 |
| ATAGATAAAATCCGACTTCGTTTATAGGTGTAACTACCCCAACCAACGAGGAGTGTAGTAAAGATGTTGGCAGTAAACAAATCTGTGACTATAAATC | 800 |
| I D K S D F V F R C N L P P T T G D V S K D V G S K T N L V T I N P | 237 |
| CAAGCATATAACTCTGAAATATGGGAATTAAGGAAAAAAGCCCTATTTTGGAGGACCTGTGAACCTATGAGATGCAATTTTTCGTCGCAAGC | 900 |
| S I I T L K Y G N L K E K K A L F L E D I A T Y G D A F F F L P A | 270 |
| ATTTTCTCTCAGGGCCAAACAGGGTACCTCTTTCAAAGTATACTACACGCTCGAAGAGTCTAAAGCAAGACAAAAGGTTCTATTTTCCATCCCAAGTAC | 1000 |
| F S F R A N T T G T T S F K V Y Y T L E E S K A R Q K V L F F H P K Y | 303 |
| CTGAAGAGTCTGGCCCTTTCTGGGAGAACTAAAGGTTGACTGCAATACCGCTTGTCACCGGCTTGATGATCACAAGTGTGCAVGTGGAAGTCTGTGTA | 1100 |
| L K D L A L F W R T K G V T A Y R L S T C G G L M I T S V A V E L C K N | 337 |
| ATGTGAAGCTGTATGGAATCTGGCCCTTCTCTAAAACTGTAGAAGACATACCTGTGAGCCATCACTATTATGACAACAGCTACCTAAACATGGTTTCCA | 1200 |
| _ V _ K _ L _ Y _ G _ F _ W _ P _ F _ S K T V _ E D I P V S H H Y Y D N K L P K H G F [H] | 370 |
| TCAGATGCCAAAGAATACAGCCAGATCCTCCAACCTTCACATGAAAGGAATCCTCAAACCTGCAATTTAGCAAAATGTGAAGTCGCCTAAACAAAGTATCTT | 1300 |
| Q M P K [E] Y S Q I L Q L H M K G I L K L Q P S K C E V A * | 398 |
| AAAAATGGGAATATTTTAAATATGACAGTAGGTGATTAAACATGCTTCCAACACCAAGAGGGTGGCTAAAGAGTATTTTGAATGAGCCCCAAAAT | 1400 |
| TGGTTTGACAAACAACTTCCCACTCAATTTGCAATGATGGCAAGTCAATCTTCTCACTCTTCATTTTTCTCTCTTAACTATGACGACCACTATCTG | 1500 |

图2

A

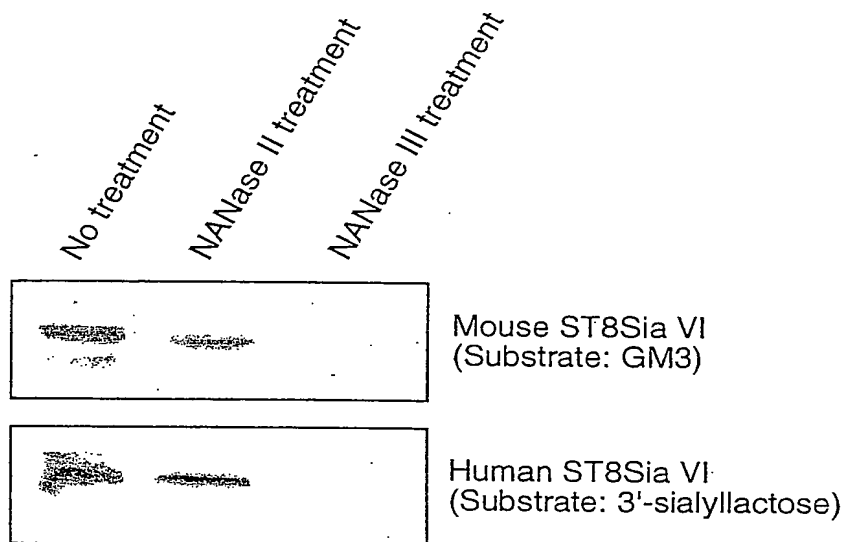
| | | | |
|-----------|-----|---|-----|
| ST8Sia I | 1 | N--S--RCG--RAIHTSR-----G--AM--AM--AR---R--F--PF--T--RL--PVG---A-- | 31 |
| ST8Sia V | 1 | MRYADESANSRDIILGNRTLLFFITCAFAIVTLIQQILYSESYIKR--GFQFGWQRGIQQPNW | 59 |
| ST8Sia VI | 1 | -----MRSGGT--LFAIIGSLMILLLLRMLWCPADAPAFSRLLEMGSEDTSGTS | 48 |
| ST8Sia I | 32 | SAI-----C-V---VV--LCWLY-IF--EV-Y--R--IPNEKETVQG-VIA---QRT--A | 66 |
| ST8Sia V | 60 | TGLFNDSISPTEQNITGSSSRIFEFYREHLEFNSTECIELRQEIIEVKVISMVKGSEITFE | 119 |
| ST8Sia VI | 49 | AAI--KTLWSPTTPVPRTRNSTYLD--EHTTQITEKCKDLQYSLNSISNSTRYSSEDDYL--Q | 105 |
| ST8Sia I | 67 | -WRT-N--Q---TS--ASLFFROMEDCCIPAHLEAMTKMNSRMGKSIWYDGEILLYSFTIT | 117 |
| ST8Sia V | 120 | RWKSILICKWAMGASEASLHKSTISRCCNAPNLFITTCKNTPVETNIRYEVESSGLYHII | 179 |
| ST8Sia VI | 106 | TITNIGRCFWRNRQAEFYDNFRAKLASCCDAIQDFVVSQNNTPVGTNMSYEVESSKKHIFIR | 165 |
| ST8Sia I | 118 | NSTYSLFFQATE--FQLEIKKCAVVGNGGILKMSGCARCIIEPNFVMRCNLPHLSSEYTRD | 176 |
| ST8Sia V | 180 | QEIFKMFPEKEMFYYSQFKKCAVVGNGGILKNSGCCKEINSADFVFRCNLPPISGIYTTD | 239 |
| ST8Sia VI | 166 | ENIFHMFVVSQDFVDYHYNQCAVVGNGGIINKSLCGAEIKSDVFRCNLPPTTGSASKU | 225 |
| ST8Sia I | 177 | VGSKTCLVTANPSIIRQRENI--LWSKKKFDNMKIYNHSYIYMPAFSMKTGTETPLRVY | 235 |
| ST8Sia V | 240 | VGEKTDVTVNPSIITDRHKKLEKW--RRFFSVLQRYENASVLLPAHYNVNRTLVSFRVK | 298 |
| ST8Sia VI | 226 | VGSKTNLVTNPSIITLKYCNLKE--KKAQFLEDISTYGDFFILLPAFSYRANTGISFVKY | 284 |
| ST8Sia I | 236 | YTLKLVGANQTVLFANENLEFNIGKFWKSRGIHAKRLSTGLFLVSAALGLCEEVSIYGFW | 295 |
| ST8Sia V | 299 | YMTIDFQSRCPVYFFHEQYISSVSRYWLSLGVRRRHISTGLSLVTAALCELCEEVHIFGFW | 358 |
| ST8Sia VI | 285 | QTLKESKMRCKVLFPHRYLHLALFWRTKGVTAAYRLSTGLMIASVAVELCENVKLYGFW | 344 |
| ST8Sia I | 296 | PFSVNMCGDPISSHYYDNVLFESGYHAMFEEFLGLWYLLKIKALHMLDPCCEPSPQPTS | 355 |
| ST8Sia V | 359 | AFPMNPSGFFITSHYYDNVKKPKPGFHAMFSEIFTFIRMHSGILVHTGTQ--NCC----- | 412 |
| ST8Sia VI | 345 | PFSKTIETITLSSHYYDNMLPKHGFHQMKEYSCMLQLHMRGILKLFKSCETA----- | 398 |

B

| | | | |
|------------|-----|---|-----|
| mST8Sia VI | 1 | MRSGGTILFAIIGSIMLLLLLLRMLWCPADAPAFSRLLEMGSEREDTSGTSAALKTILWSETTIP | 60 |
| hST8Sia VI | 1 | MRPGGAILLALLASILLLLLLRLLWCPADAPAFSRLLEMGSEREDTSGTSAALKTILWSETTIP | 60 |
| mST8Sia VI | 61 | VPRTRNSTYIDERTTQITEKCKDLQYSENLSENKTRRYSEDDYLCITITNIGRCPWNRQAE | 120 |
| hST8Sia VI | 61 | VPRATNSTYINERSLQITEKCKNLQYGIESFSNKTGKYSEDDYLCITITNIGRCPWNRQAE | 120 |
| mST8Sia VI | 121 | EYDNFRAKLASCCDAIQDFVVSQNNTPVGTNMSYEVESSKKHIFIRENIFHMFVVSQPFVI | 180 |
| hST8Sia VI | 121 | EYANFRAKLASCCDAVQNFVVSQNNTPVGTNMSYEVESSKKHIFIRKKNIFHMFVVSQPFVI | 180 |
| mST8Sia VI | 181 | YPYNQCAVVGNGGILNKSLLCGAEIDKSDVFRCNLPPIITGSASKDVGSKTNLVTNPSII | 240 |
| hST8Sia VI | 181 | YPYNQCAVVGNGGILNKSLLCGTEIDKSDVFRCNLPPIITGDDVSKDVGSKTNLVTNPSII | 240 |
| mST8Sia VI | 241 | TLKYCNLKEKKAFLEDISTYGDALLLLPAFSYRANTGISFVKYQTLKESKMRQKVLFPH | 300 |
| hST8Sia VI | 241 | TLKYCNLKEKKALFLEDIATYGDALFFLLPAFSFRANTGTISFVKYVITIEESKARQKVLFPH | 300 |
| mST8Sia VI | 301 | ERYIRHLALFWRTKGVTAAYRLSTGLMIASVAVELCENVKLYGFWPFSKTIETITLSSHYY | 360 |
| hST8Sia VI | 301 | EKYIKDLALFWRTKGVTAAYRLSTGLMITSVAVELCKNVKLYGFWPFSKTIETITLSSHYY | 360 |
| mST8Sia VI | 361 | DNMLPKHGFHQMKEYSCMLQLHMRGILKLFKSCETA | 398 |
| hST8Sia VI | 361 | DNKLPKHGFHQMKEYSCILQLHMRGILKLFKSCETA | 398 |

3

A



B

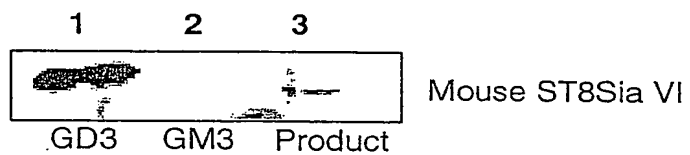


图4

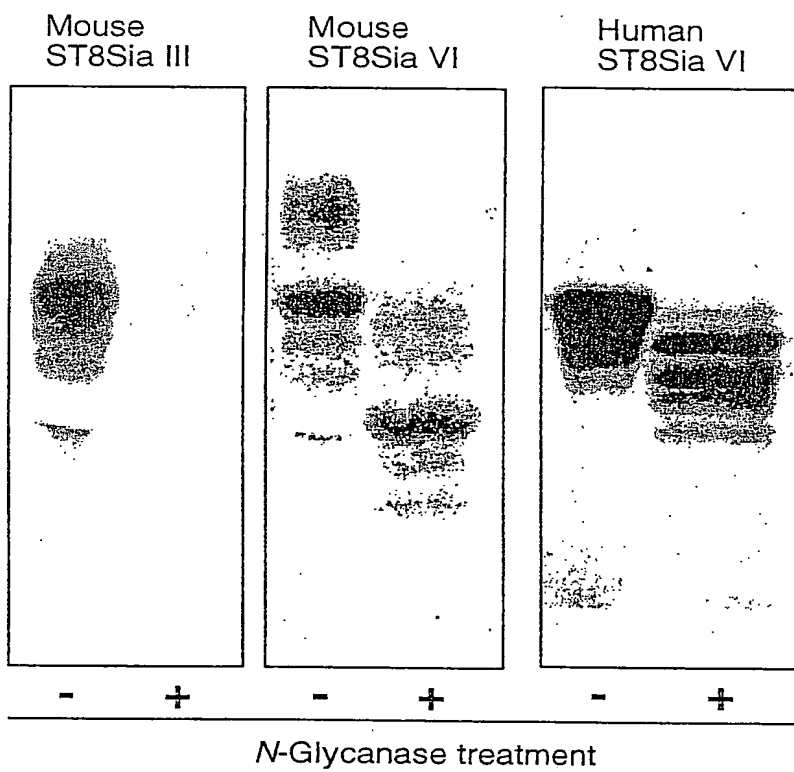
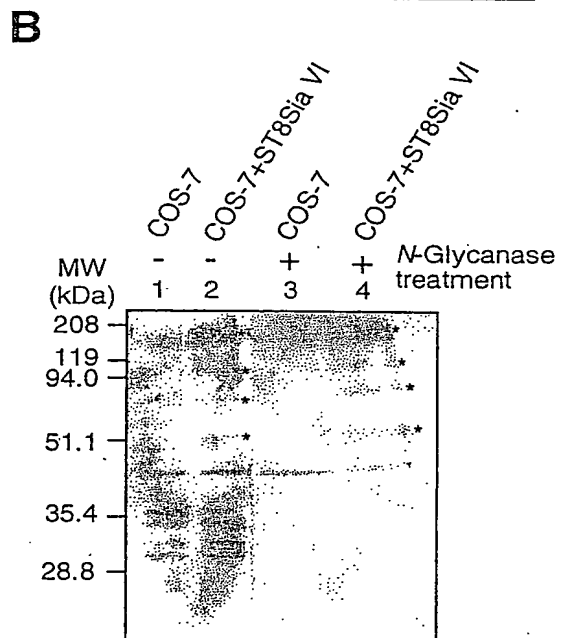
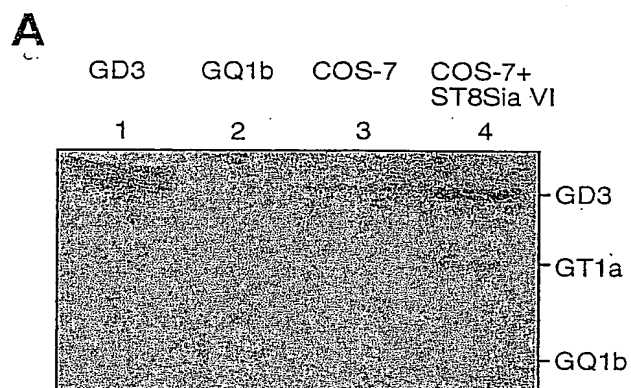
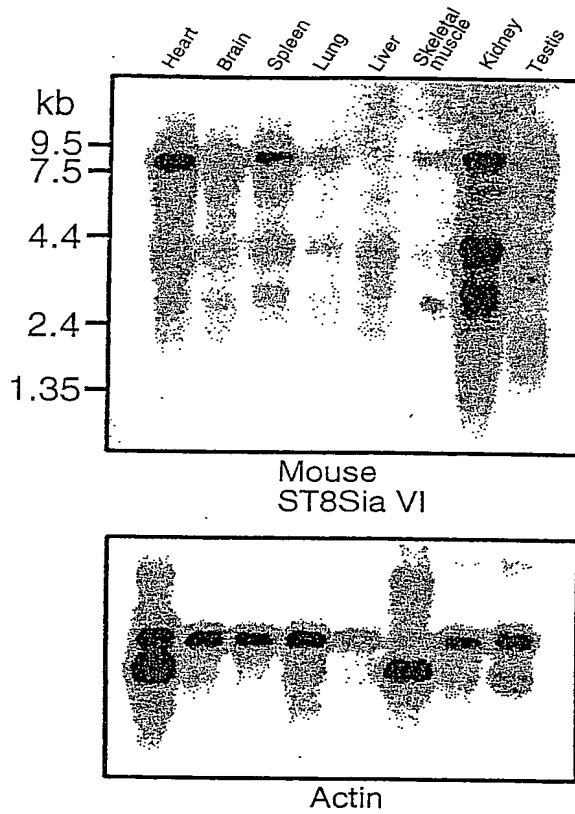


图 5

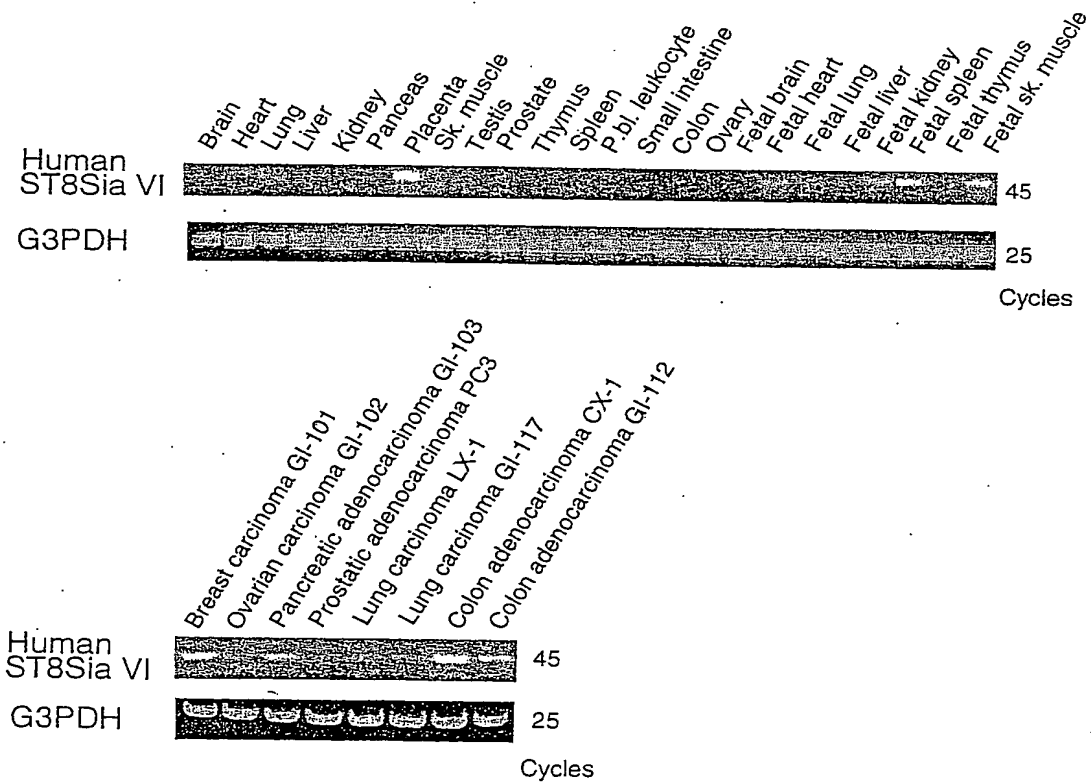


6

A



B



7

A

Human ST6Gal II

```

ggcgccgggactccctcctggcgccccacagcctgtgcgcattcctgcattcctgcgcgcgcggggacccgagccccggagggtgtccaggcgcggtgc 100
caggcggtgtactgtgcagggttcattcctgccaccatctgcattaaagacacaagggtgctgaccgcagagacctgccatgaaaccacacttgaagcaatgga 200
      M K P H L K Q W R
gacaacgaatgcttttcggaatattcgccttgggggctcctcttttgcgtattttcatctacttcaccgacagcaaccccgctgagcctgtaccagctc 300
      Q R M L F G I F A W G L L F L L I F I Y F T D S N P A E P V P S R
cctctccttctctggagaccaggaggctcctgcgcgtgacgggggaagcagcgggccatcatggcgccgcacatgagccctcccgctgggggctggac 400
      L S F L E T R R L L P V Q G K Q R A I M G A A H E P S P P G G L D
gcacgccaggcgctgccccgcgccaccagcggttcctttcatgcggggcctggagacctgcagaaatgggcccagctcccaagatgggtttgaacata 500
      A R Q A L P R A H P A G S F H A G S F G D L Q K W A Q S Q D G F E H K
aagagttttttcatccaggtgggggagaaatctcaaagtcctttctaccggaggatgacgactactttttgctgctggtcagccagggtggcacag 600
      E F F S S Q V G R K S Q S A F Y P E D D D Y F F A A G Q P G W H S
ccactcaggggacattgggattccttccccgggggacaggccacgggagggggcttttcggctgcacaggtccagaggaggcggtgaagaag 700
      H T Q G T L G F P S P G E P G P R E G A L F P A A Q V Q R R R V K K
aggcaccggaggcagagaaggaccacgtgttggaggagggcgacgacggcgacagggtgtactcctccatgtccaggggccttctgtaccggctctgga 800
      R H R R Q R R S H V L E E G D D G D R L Y S S M S R A F L Y R L W K
aggggacgtctcttccaaatgctgaacccgcgcctgcagaaggcgatgaaggattacctgaccgccaacaagcacggggtgcgcttccgcgggaagcg 900
      G N V S S K M L N P R L Q K A M K P G D L Q K W A Q S Q D G F E H K
ggaggccgggctgagcaggccacagctgctgtgccagctgcggagccgcgcgcgtgcggacgctggacggcaccgaggcgccctttctgcgctgggc 1000
      E A G L S R A Q L L C Q L R S R A R V R T L D G T E A P F S A L G
tgccggcgctggtgcgcgcgtgcgcctgagccagctgcgcgtgctgcgtgctgcgtgctgcgtgctgcgtgctgcgtgctgcgtgctgcgtgctgc 1100
      W R R L V P A V P L S Q L H P R G L R S C A V V M S A G A I L N S S
ccttggcgaggaaatagattctcatgatgcgggttttgagatttaactctgctcctacacgtggttatgagaaagatgttgggaataaaaccaccatag 1200
      L G E E I D S H D A V L R F N S A P T R G Y E K D V G N K T T I R
catcattaattcgcagattctgaccaacccagccatcacttcattgacagttcactgtataaaagacgtcattttggtggcctgggacccctccccatat 1300
      I I N S Q I L T N P S H H F I D S S L Y K D V I L V A W D P A P Y
tccgcaaatcttaacctgtggtacaaaaaacggattacaacctgttccactccatatattcagcatcgtcagagaaaccccaatcagccattttacattc 1400
      S A N L N L W Y K K P D Y N L F T P Y I Q H R Q R N P N Q P F Y I L
ttcatcctaaatttatatggcagctctgggatattatccaggagaacactaaagagaagattcaaccaaaccaccatcttctggtttcattggaatcct 1500
      H P K F I W Q L W D I I Q E N T K E K I Q P N P P S S G F I G I L
catcatgatgtccatgtgcagagaggtgcacgtgtatgaatatacccatccgtgcggcagacggagctgtgcccactaccacagagctgtactacgacgca 1600
      I M M S M C R E V H V Y E Y I P S V R Q T E L C H Y H E L Y Y D A
gcctgcaccctcggggcgctaccaccactactctatgagaagctcctggtgcagcgccctgaacatgggcacgcagggggatttgcatcgcaagggaagg 1700
      A C T L G A Y H P L L Y E K L L V Q R L N M G T Q G D L H R K G K V
tggtttcttctggcttccaggcggtgcactgcccctgcaccaagtcagtcattccacactcttaaaaaagggtttcttgggaatcaatgtgcaataaggta 1800
      V L P G F Q A V H C P A P S P V I P H S *

```

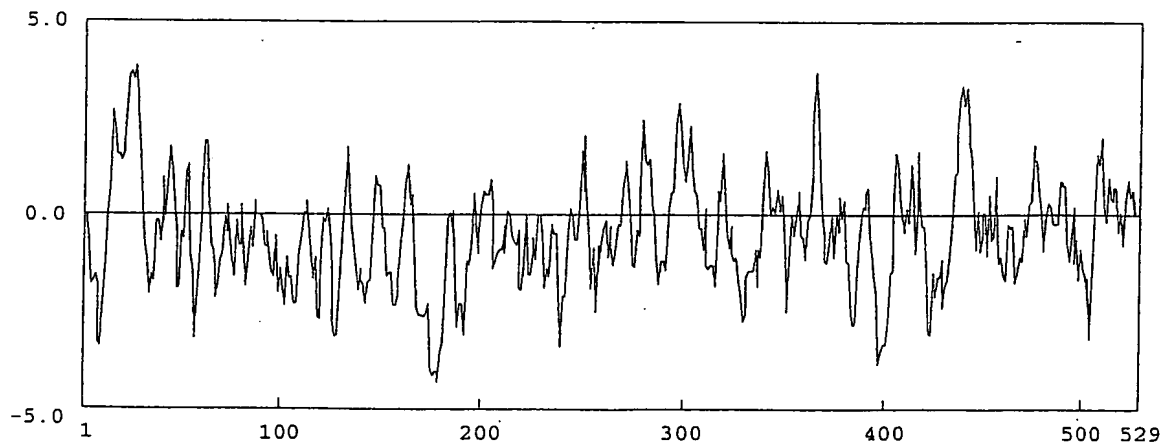
Short form

```

ttcatcctaaatttatatggcagctctgggatattatccaggagaacactaaagagaagattcaaccaaaccaccatcttctggtttcattggctcatt 1500
      H P K F I W Q L W D I I Q E N T K E K I Q P N P P S S G F I G S F
tgtaaaaattggccatatcagagcttgacgtgagccgagatcacgcgactgcactccagcctggacgacagagtgagactccatctcaaaaaaaaaa 1600
      V K I G H I R A C S E F R S R D C T P A W T T E *

```

B



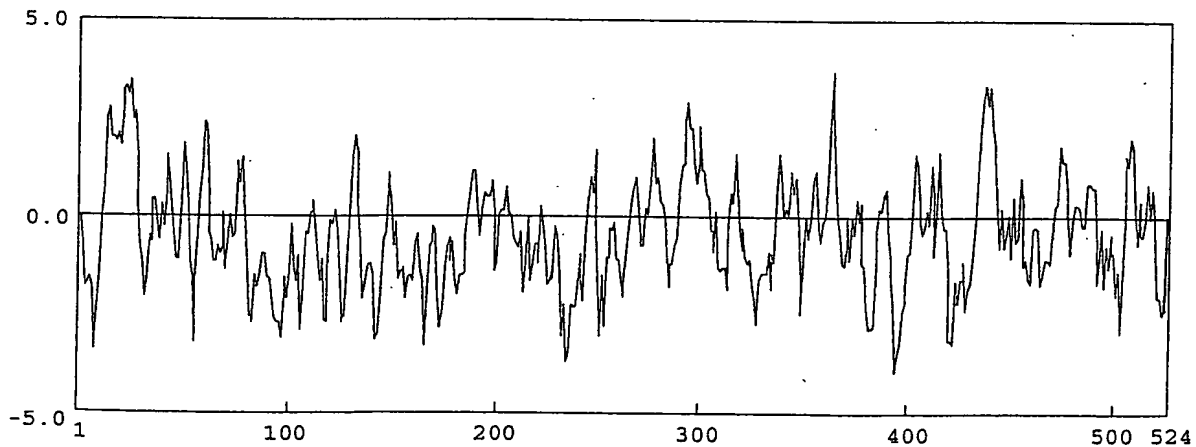
8

A

Mouse ST6Gal II

| | |
|---|------|
| CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGACACGAATGCTCTTTGGAATATTGTTTGGGGGCTCCTCTTTTGGCAATTTTCATCTACTTCACCAACAG | 100 |
| M K P H L K Q W R Q R M L F G I F V W G L L F L A I F I Y F T N S | 33 |
| CAATCTGCGGCACCTATGCCAGCTCCTTTTCTTCTGAGAGCCGTGGGCTCCTGCTCTACAGGGCAAGCAGCGGGTCATCATGGGCGCTTTCAG | 200 |
| N P A A P M P S S F S F L E S R G L L P L Q G K Q R V I M G A L Q | 66 |
| GAACCTCTTTGCCAGAAGTTTGGATGCAAGCAAAGTGCTTCTGGACAGCCACCTGAGAACCCTTTCCACCCTTGGCCTGGGGACCCACAGAAATGGG | 300 |
| E P S L P R S L D A S K V L L D S H P E N P F H P W P G D P Q K W D | 100 |
| ATCAGGCCCCAAATGGCTTTGACAATGGGGATGAGTTTTTACATCCCAGGTTGGGAGGAAATCACAAAGCGCTTCTATCCCGAGGAAGATAGCTATTT | 400 |
| Q A P N G F D N G D E F P T S Q V G R K S Q S A F Y P E E D S Y F | 133 |
| TTTGTGCGGATCAGCCTGAGTTGTACCAACAGGCAGGGTGCCATGAGCTGCCATCTCCAGGGGAGACATCATGGCGATCAGGACCTGTTTCAGCCC | 500 |
| F V A D Q P E L Y H H R Q G A L E L P S P G E T S W R S G P V Q P | 166 |
| AAGCAGAAGCTGCTTACCCAAGGCGAGGCAGCTTGCCTGAGGAAGCCTATGACAGCGACATGCTGTCAGCCTCCATGTCGAGAGCCTTCTGTACCGGC | 600 |
| K Q K L L H P R R G S L P E E A Y D S D M L S A S M S R A F L Y R L | 200 |
| TCTGGAAGGGCGCTGCTCTAAGATGTTGAACCGCGCCTGAGAGGCCATGCGTTACTACATGTCCTTCAACAAGCATGGTGTGCGCTTCCCGCAG | 700 |
| W K G A V S S K M L N P R L Q K A M R Y Y M S F N K H G V R F R R | 233 |
| GCGGGTTCGGCGTGAAGCTACACGTACAGGGCCGAGCTGCTGTGTGAGATGCGCAGACGTGTGCGTGTGCGCAGCTTGGACGGCAGAGAGGCGCCCTTC | 800 |
| R G R R E A T R T G P E L L C E M R R R V R V R T L D G R E A P F | 266 |
| TCGGGGCTGGGCTGGCGGCTCTGGTACCAGGTGTACCTCTGAGCCAGTTGCACCCGCGGGTCTGAGCAGCTGCGCAGTTGTCTGCTGCGGTGCCA | 900 |
| S G L G W R P L V P G V P L S Q L H P R G L S S C A V V M S A G A I | 300 |
| TCCTGAATCCTCTTGGGGGAGGAAATCGATTCTCATGATGCAGTTTGTAGATTTAACTCTGCCCTACCCGTGGCTACGAGAAAGATGTGCGAAATAA | 1000 |
| L N S S L G E E I D S H D A V L R F N S A P T R G Y E K D V G N K | 333 |
| AACCAGTACGATCATTAATCTCAGATTCTGGCCAACCCAGCCATCACTTACATTGACAGTGCTTTATATAAAGATGTTATCCTGGTAGCCTGGGAT | 1100 |
| T T V R I I N S Q I L A N P S H H F I D S A L Y K D V I L V A W D | 366 |
| CCTGCTCCTTATCTGCCAATCTTAACCTGTGGTATAAGAAGCCAGATTACAACCTTTTCACTCCATATATCCAGCATCGCCGGAATACCCGACTCAGC | 1200 |
| P A P Y S A N L N L W Y K K P D Y N L F T P Y I Q H R R K Y P T Q P | 400 |
| CATTTTACATTCTTACCCCAAGTTTCATATGGCAGCTTTGGGACATTATCCAGGAGAATACAAGGGAGAAGATACAGCCCAACCCACCATCTTCTGTTT | 1300 |
| F Y I L H P K F I W Q L W D I I Q E N T R E K I Q P N P P S S G F | 433 |
| TATTGGAATCCTCATCATGATGTCCATGTGTAAGAGGTCACGTGTATGAGTACATCCCATCTGTTTCGACAGACAGAGCTTTGCCACTACCATGAGCTG | 1400 |
| I G I L I M S M C K E V H V Y E Y I P S V R Q T E L C H Y H E L | 466 |
| TACTACGACGAGCCTGCACCTTGGGGGCTTACCACCCACTGCTCTATGAAAAGCTACTGGTGCAGCGCCTTAACACAGGCACCCAGGCAGACTTGATC | 1500 |
| Y Y D A A C T L G A Y H P L L Y E K L L V Q R L N T G T Q A D L H H | 500 |
| ACAAGGCAAGGTAGTCTTGCAGGCTTCCAGACCTTTCGGTGTCCAGTAACAGCCCCACAATACACATTCTTAAATGGAAGTCTTGGGAAGTGTG | 1600 |
| K G K V V L P G F Q T L R C P V T S P N N T H S * | 524 |
| TGCAATAAGGT | 1611 |

B



9

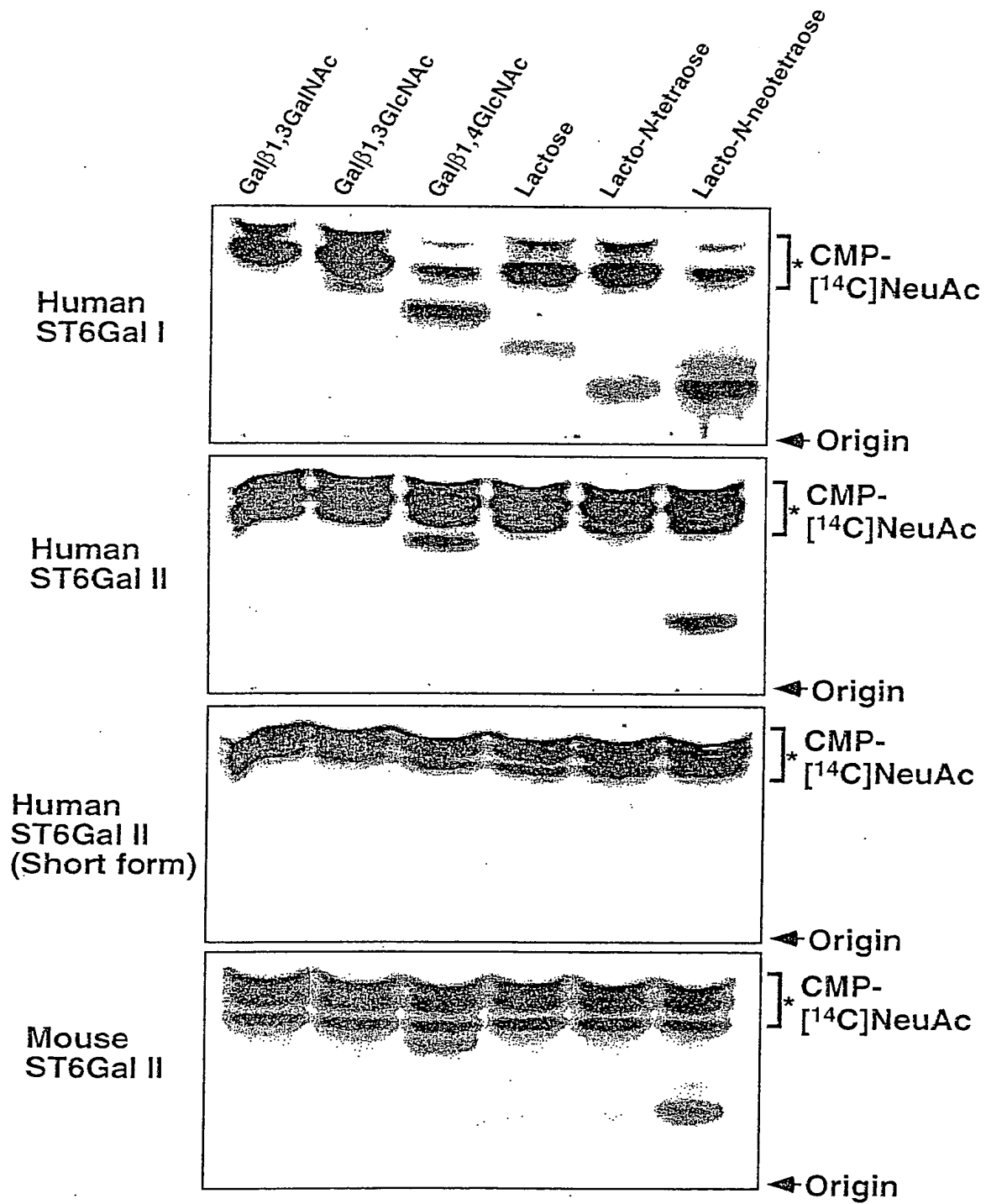
A

| | | | |
|-----------|-----|--|-----|
| ST6Gal I | 1 | M-IH-TNLKKKFSCCVLVF-LLFAVTCV-WKEKKKG-SYYDSFK-LQKKEFQVLKSLGKL | 54 |
| ST6Gal II | 1 | MKPHLKQWRQRMFLGIFAWGLLELLFIYFTDSNPAPVPVSSLSFLETRRLLPVQKQRA | 60 |
| ST6Gal I | 55 | AMGSDSQSVSSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAPEAS----- | 92 |
| ST6Gal II | 61 | IMGAAHEPSPPGGLDARQALPRAHPAGSFHAGPGDLQKWAQSQDGFHEKKEFFSSQVGRKS | 120 |
| ST6Gal I | 93 | ----- | 92 |
| ST6Gal II | 121 | QSAFYPEDDDYFFAAGQPGWHSHTQGTGLGFPSPGEPGREGAFPAQVQRRRVKKRHRRO | 180 |
| ST6Gal I | 93 | -----FQVANKDSSSKNLIIRLQKIWKNYLSMNNKYKVSYSK | 128 |
| ST6Gal II | 181 | RRSHVLEEGDDGDRLYSSMSRAFLYRLWKNVSSKMLNPRLOKAMKDVITANKHGMRFRG | 240 |
| ST6Gal I | 129 | PGPGIKFSAEALRCHLRDHVNMMSMEVVDFFPNTSEMEGYLPKESIRTKAGPWC--RCAV | 186 |
| ST6Gal II | 241 | K-REAGLSRAQLLCQLRSRARVRTLDGTEAPFSALGWRRLVFAVPL-SQLHPRGLRSCAV | 298 |
| ST6Gal I | 187 | VMSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFNAGAPTANFQODVGTKTTIRLMNSQLVT-TEKRFELK | 245 |
| ST6Gal II | 299 | VMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNAPTRGYEKDVGNKTTIRIINSQILNPSHHFI | 358 |
| ST6Gal I | 246 | DSLYNEGTLIVWDFSVVHSDIPKWKYQNPFDYNFFNNYKTYRKLHPNQPFYILKEQMPWELW | 305 |
| ST6Gal II | 359 | SSLYKDVILVAWDPAFYSANLNLWYKKPDYNLFTPYIQHRRQNRNNOFFYILHFKFIWQLW | 418 |
| ST6Gal I | 306 | DILQETISPEETQPNPPSSGMLGIIIMMTLDDQMDIYEFLLPSKRKTDVQYKYQKFFDSACT | 365 |
| ST6Gal II | 419 | WDIIQENTKEKIQPNPPSSGFIGILIMMSMCREVHVVEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC | 478 |
| ST6Gal I | 366 | MGAYHPLLYEKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC | 406 |
| ST6Gal II | 479 | LGAYHPLLYEKLVLVQRLNMTGTQGLHRKKGKVVLPGFQAVHCPAPSPVIPHS | 529 |

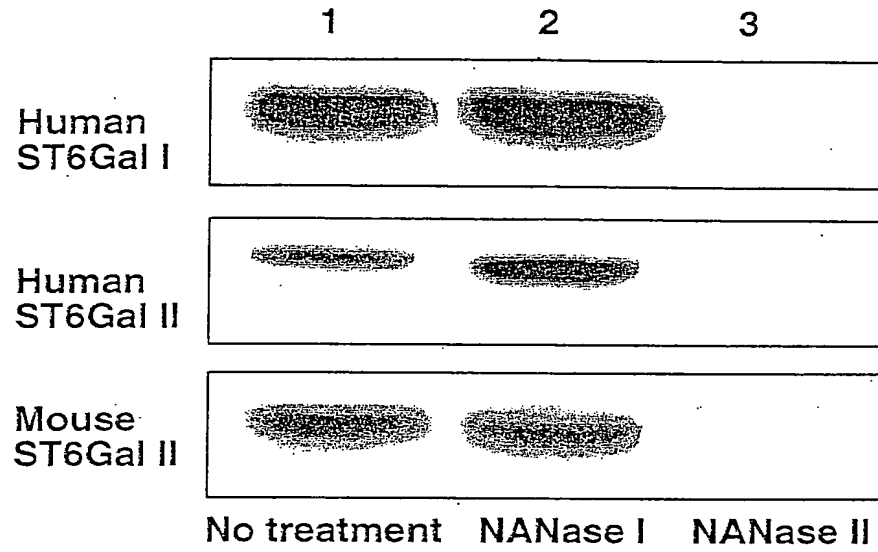
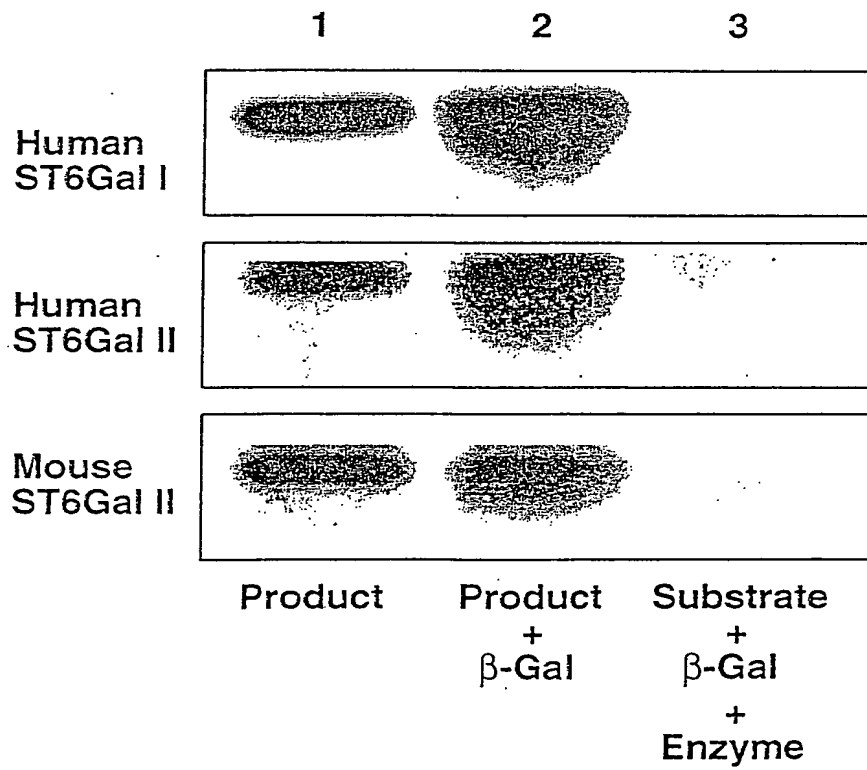
B

| | | | |
|------------|-----|---|-----|
| hST6Gal II | 1 | MKPHLKQWRQRMFLGIFAWGLLELLFIYFTDSNPAPVPVSSLSFLETRRLLPVQKQRA | 60 |
| mST6Gal II | 1 | MKPHLKQWRQRMFLGIFVWGLLELLFIYFTNSNPAAEMPSSFSFLESRLLELQKQQRV | 60 |
| hST6Gal II | 61 | IMGAAHEPSPPGGLDARQALPRAHPAGSFHAGPGDLQKWAQSQDGFHEH-KEFFSSQVGRK | 119 |
| mST6Gal II | 61 | IMGALQEPSSLERSLDASKVLLDSHPENPFHPWPGDPQKWDQAPNGFDNGDEFFTSQVGRK | 120 |
| hST6Gal II | 120 | QSAFYPEDDDYFFAAGQPGWHSHTQGTGLGFPSPGEPGREGAFPAQVQRRRVKKRHRRO | 179 |
| mST6Gal II | 121 | QSAFYPEEDSYFFVADQPELYHHROGALQLPSPGETSWRSG--E---VQPKQ-KLLH-- | 172 |
| hST6Gal II | 180 | QRRSHVLEEGDDGDRLYSSMSRAFLYRLWKNVSSKMLNPRLOKAMKDVITANKHGVRFR- | 238 |
| mST6Gal II | 173 | PRRGSLEPEAYDSMLASMSRAFLYRLWKGAVSSKMLNPRLOKAMRYMSFNKHGVRFR | 232 |
| hST6Gal II | 239 | -RGKREAGLSRAQLLCQLRSRARVRTLDGTEAPFSALGWRRLVFAVPLSQLHPRGLRSCA | 297 |
| mST6Gal II | 233 | RRGRREATRTGPELLCEMRRRVVRVRLDGREAPFSGLGWRPLVFGVPLSQLHPRGLSSCA | 292 |
| hST6Gal II | 298 | VMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNAPTRGYEKDVGNKTTIRIINSQILNPSHHFI | 357 |
| mST6Gal II | 293 | VMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNAPTRGYEKDVGNKTTVRIINSQILANPSHHFI | 352 |
| hST6Gal II | 358 | DSLYKDVILVAWDPAFYSANLNLWYKKPDYNLFTPYIQHRRQNRNNOFFYILHFKFIWQL | 417 |
| mST6Gal II | 353 | DSALYKDVILVAWDPAFYSANLNLWYKKPDYNLFTPYIQHRRKYETQFFYILHFKFIWQL | 412 |
| hST6Gal II | 418 | WDIIQENTKEKIQPNPPSSGFIGILIMMSMCREVHVVEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC | 477 |
| mST6Gal II | 413 | WDIIQENTREKIQPNPPSSGFIGILIMMSMCREVHVVEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC | 472 |
| hST6Gal II | 478 | TLGAYHPLLYEKLVLVQRLNMTGTQGLHRKKGKVVLPGFQAVHCPAPSPVIPHS | 529 |
| mST6Gal II | 473 | TLGAYHPLLYEKLVLVQRLNMTGTQGLHHRKKGKVVLPGFQTLRCHVTSFNNTHS | 524 |

☒ 10



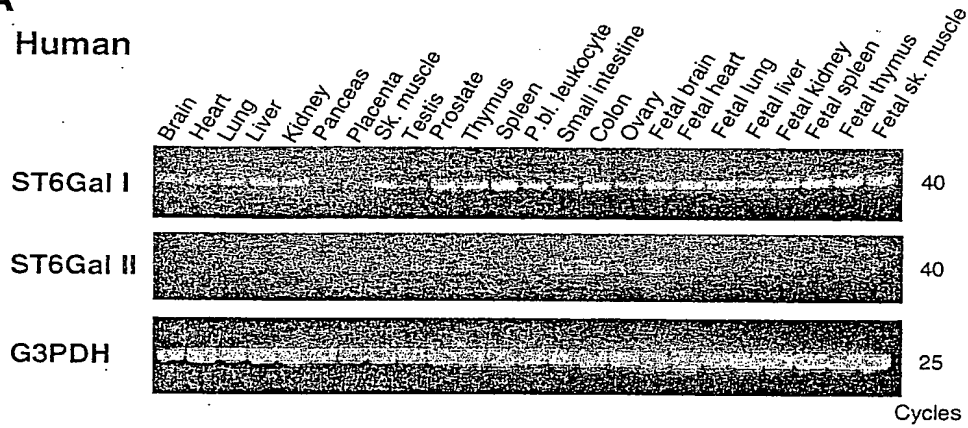
☒ 1 1

A**B**

1 2

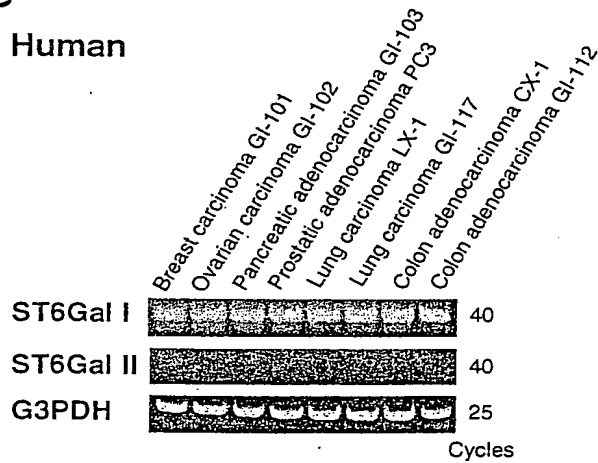
A

Human



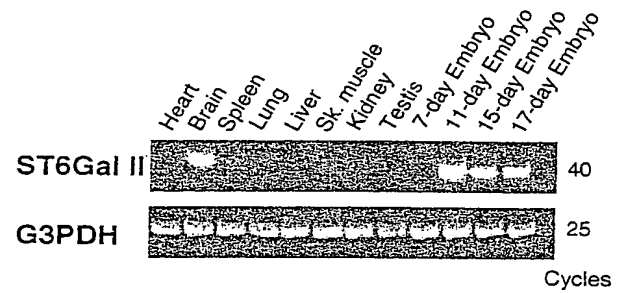
B

Human



C

Mouse



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.